

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CIBLAGE THÉRAPEUTIQUE DES INTERACTIONS PRO-INFLAMMATOIRES
LORS DE LA PROGRESSION TUMORALE DU CARCINOME
UROTHÉLIALE DE LA VESSIE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
VALÉRIE BOULANGER

JANVIER 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*<<The future belongs to those who believe in the
beauty of their dreams>> –Eleanor Roosevelt*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de laboratoire, Carlos Reyes-Moreno, de m'avoir donné la chance de faire partie de cette belle équipe de recherche. Ce temps passé au laboratoire m'a permis non seulement de rencontrer de merveilleuses personnes, mais également de découvrir toute l'importance et l'ampleur du monde de la recherche. Je suis également très reconnaissante d'avoir pu côtoyer cette grande famille, composée de Julie, Jovane et Marion pour leur aide inestimable, leur bonne humeur et leurs nombreux conseils. De plus, il est important de mentionner l'aide précieuse et les nombreuses molécules fournies par Gervais Bérubé, mon codirecteur. Finalement, je tiens à mentionner que Djamel Ramla, Lionel Berthoux et Céline Van Themsche ont mis à notre disposition des instruments qui nous ont permis de réaliser plusieurs expériences tout au long de ma maîtrise.

RÉSUMÉ

La lutte contre le cancer est une partie prenante dans les différentes sphères du système de la santé depuis plusieurs années. Plus récemment, une corrélation importante entre l'inflammation chronique et le développement tumoral a pu être établie. Celle-ci est observable, entre autres, chez le carcinome urothélial de la vessie. Cette étude visera particulièrement l'inhibition de cette interaction entre les cellules cancéreuses et pro-inflammatoires pour permettre de contrer l'initiation, la prolifération, l'angiogenèse et la migration tumorale. Cette communication est possible, entre autres, grâce aux médiateurs inflammatoires comme les cytokines TNF α et IL-6 qui activent respectivement les facteurs de transcription NF κ B et Stat3. Ces cytokines sont donc sécrétées par les leucocytes à la suite d'une réaction inflammatoire et sont captées par des cellules de l'urothélium endommagé qui à leur tour, sécrètent ces mêmes cytokines qui vont suractiver les macrophages pro-inflammatoires. Pour remédier à cette chaîne d'activation, nous avons caractérisé de nouveaux dérivés de l'acide para-aminobenzoïque, montrant un fort potentiel anti-inflammatoire. Nous montrons ici leurs activités anti-inflammatoire et anticancéreuses autant *in vitro* sur les cellules T24 et MB49-I, deux modèles du cancer de la vessie humain et murin, respectivement, que *in vivo* sur les tumeurs dérivées des cellules MB49-I implantées de façon ectopique sur les flancs des souris C57BL/6J.

Mots-clés : Thérapie anti-cancer, inflammation, cancer de la vessie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer de la vessie	1
1.1.1 Incidence et facteurs de risque.....	1
1.1.2 Les traitements actuels.....	3
1.2 Le développement tumoral du CUV.....	4
1.2.1 La vessie	4
1.2.2 Initiation tumorale.....	6
1.2.3 Inflammation chronique et progression tumorale.....	8
1.3 La problématique.....	14
1.4 L'hypothèse	14
1.4.1 Études précédentes : les DABs	15
1.5 Objectifs.....	18
CHAPITRE II	
APPROCHES EXPÉRIMENTALES PRIVILÉGIÉES ET MÉTHODOLOGIQUES ..	19
2.1 Culture cellulaire	19
2.2 Immunodétection des protéines d'intérêts	20
2.3 Test de réactif de Griess pour l'évaluation de la production de NO	21
2.4 Gène rapporteur de la luciférase.....	21
2.5 Test d'invasion	22
2.6 Test de motilité « Scratch »	23
2.7 Test de prolifération/survie cellulaire par MTT	23
2.8 Modèle de tumeur de cancer murin de la vessie.....	24

2.9	Coloration HES.....	24
2.10	Analyse statistique	26
CHAPITRE III		
RÉSULTATS		27
3.1	L'effet modulateur d'AL-549 sur la voie de signalisation TNF α /NF κ B et son impact au niveau de la régulation du système iNOS/NO dans les cellules MB49-I et T24	27
3.2	L'action d'AL-549 sur l'activité invasive des cellules humaines T24 du cancer de la vessie.....	30
3.3	L'impact d'AL-549 sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 et de son effet sur la mobilité cellulaire des T24	31
3.4	Étude comparative de l'activité anti-inflammatoire d'AL-549 avec certaines DABs de 2 ^e génération via la mesure de production en NO	33
3.5	Effets des DABs sur la cytotoxicité des cellules MB49-I	34
3.6	Vérification de la capacité inhibitrice de ML-28 sur l'activation des voies de signalisation TNF α /NF κ B et IL-6/STAT3 dans les cellules murines (MB49-I) et humaines (5637) du cancer de la vessie	35
3.7	Étude comparative de l'activité inhibitrice d'AL-549 avec ML-28 sur la croissance des tumeurs dérivées des cellules MB49-I implantées de façon ectopique sur les flancs des souris C57BL/6J	37
CHAPITRE IV		
DICUSSION		42
CHAPITRE V		
CONCLUSION		50
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		52
ANNEXE A		
TESTS DE VIABILITÉ DES CELLULES MB49-I PRÉTRAITÉES AVEC AL-549		63

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Illustration de la progression tumorale au sein des différentes composantes de la paroi vésicale selon les différents stades	6
1.2 Illustration de la voie de signalisation $TNF\alpha/TNFR1/NF\kappa B$	10
1.3 Illustration de la molécule du PABA et d'un de ses dérivés, l'AL-549	15
1.4 Résultats <i>in vivo</i> de la viabilité, de la grosseur de tumeurs et du nombre de métastases chez les souris C57B1/6J inoculées avec les cellules MB49-I	16
1.5 Illustration de la molécule AL-549 et de ses dérivés : ML-19, ML-31B, ML31E, ML-28	17
3.1 La modulation d'AL-549 sur la phosphorylation d' $I\kappa\beta$ induit par $TNF\alpha$ dans les cellules du CUV murin MB49-I et du CUV humain T24	28
3.2 L'impact d'AL-549 sur la régulation du système iNOS/NO induit par $TNF\alpha$ dans les cellules MB49-I	29
3.3 L'effet modulateur d'AL-549 au niveau de l'activation de la voie $TNF\alpha/NF\kappa B$ dans les cellules MB49-I	30
3.4 Activité inhibitrice d'AL-549 sur l'invasion des cellules T24 en coculture avec les macrophages	31
3.5 Effet modulateur d'AL-549 sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 dans les cellules MB49-I et T24	32
3.6 Effet modulateur d'AL-549 sur la motilité induite par IL-6 dans les cellules T24 du cancer humain du CUV	33
3.7 Production en NO induit par des signaux inflammatoires dans les cellules MB49-I prétraitées ou non avec différents DABs	34
3.8 Le % de cellules viables par rapport au type de prétraitement selon différentes concentrations de DABs chez les MB49-I	35
3.9 La modulation de ML-28 sur la phosphorylation d' $I\kappa\beta$ induit par $TNF\alpha$ dans les cellules du CUV murin MB49-I et du CUV humain 5637	36

3.10	Effet modulateur de ML-28 sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 dans les cellules MB49-I et 5637	37
3.11	Volume tumoral de tumeurs MB49-I ectopiques chez les souris C57BL/6J traitées ou non avec AL-549 ou ML-28	38
3.12	Poumons de souris C57BL/6J portant des tumeurs MB49-I ectopiques et traitées ou non avec AL-549 ou ML-28	39
3.13	Coloration HES des poumons de souris C57BL/6J portant des tumeurs MB49-I ectopiques et traitées ou non avec AL-549 ou ML-28	40
3.14	Coloration HES des foies de souris C57BL/6J portant des tumeurs MB49-I ectopiques et traitées ou non avec AL-549 ou ML-28	41
A.1	Représentation de la viabilité relative des cellules MB49-I prétraitées avec AL-549 à différentes concentrations et activées ou non par des cytokines pro-inflammatoires	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
BCG	Bacille Calmette-Guérin
CUV	Carcinome urothélial de la vessie
DAB	Dérivé de l'acide <i>para</i> -aminobenzoïque
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
FAD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FBS	Sérum de fœtus de bovin
HES	Hématoxyline/éosine/safran
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IκK	Inhibiteur kappa Kinase
IL	Interleukine
INFγ	Interféron gamma
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxyde Synthase</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharides
Mφ-1	Macrophage pro-inflammatoire
MAT	Macrophages associés aux tumeurs
MMP-9	Métalloprotéase matricielle 9
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Oxyde nitrique
PABA	Acide <i>para</i> -aminobenzoïque

PBS	Tampon phosphate salin
PD-1	<i>Programmed Death-1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
STAT3	Signal transducteur et activateur de la transcription 3
TEM	Transition épithéliale mésenchymateuse
TLR4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF α	Facteur de nécrose tumorale alpha

LISTE DES SYMBOLES

α	Alpha
β	Beta
$^{\circ}$	Degré
γ	Gamma
κ	Kappa
μ	Micro
$\%$	Pourcent

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer de la vessie

1.1.1 Incidence et facteurs de risque

Le cancer est une maladie qui affecte tous les Canadiens que ce soit d'une manière directe ou indirecte. En effet, en date de l'année 2019, c'est environ 220 400 Canadiens qui ont reçu un diagnostic de cancer ce qui amène à la statistique suivante : environ 1 Canadien sur 2 sera atteint d'un cancer au cours de sa vie et 1 sur 4 en décèdera (Canadian Cancer Statistics 2019). En ce qui concerne le cancer de la vessie, c'est plus de 11 800 Canadiens qui recevront ce diagnostic et 2500 qui en mourront au cours de la prochaine année (Canadian Cancer Statistics 2019). Cette dernière statistique représente environ 3 % des décès associés à tous les types de cancer (Canadian Cancer Statistics 2019). Par ailleurs, au niveau mondial, le cancer de la vessie se positionne en 9^e position pour ce qui est de son incidence (Wong et al., 2018).

Il existe plusieurs formes de cancer de la vessie, mais seulement trois différentes formes représentent 97 % de ceux-ci; le carcinome épidermoïde où l'urothélium se différencie en cellule malphigienne et concernant 5 % des cas; l'adénocarcinome de la vessie qui prolifère au sein des cellules glandulaires avec seulement 2 % de représentation; finalement, le carcinome urothélial de la vessie (CUV) aussi appelé carcinome transitionnel représentant 90 % des diagnostics et de ceux-ci, 40 à 50 % des tumeurs sont invasives (Canadian Cancer Statistics 2019). Les hommes ont de 3 à 4 fois plus de risque de développer un cancer de la vessie comparativement aux femmes (Dobruch et al., 2016; Mizushima, Tirador et Miyamoto, 2017). Malgré ces statistiques, les recherches visant à déterminer le rôle des récepteurs à androgènes dans le développement tumoral du CUV ne sont pas encore concluantes (Dobruch et al., 2016; Li, Chen et Miyamoto, 2017).

Il y a évidemment une foule de facteurs de risques associés au CUV, que l'on retrouve également en grand nombre dans d'autres types de cancers. Pour commencer, le facteur numéro un est sans surprise de fumer la cigarette (Al-Zalabani, Stewart, Wesselius, Schols et Zeegers, 2016; Jin et al., 2017; Letasiova et al., 2012). Les amines aromatiques contenues dans la fumée qui est inhalée sont responsables de l'inhibition exercée sur la réparation de l'acide désoxiribonucléique (ADN) et de promouvoir la transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) (Besaratnia et Tommasi, 2013). Par ailleurs, les amines aromatiques sont présentes dans la peinture, le plastique, le métal et la teinture pour cheveux (Letasiova et al., 2012). Selon une étude, la benzidine serait l'amine aromatique la plus cancérigène, au niveau du cancer de la vessie, et se retrouve dans la teinture et le caoutchouc (Golka, Wiese, Assennato et Bolt, 2004).

Également, un autre facteur de risque important au développement du CUV est la concentration d'arsenic inorganique dans l'eau consommée (Malats et Real, 2015). Pour être considérée comme ayant un impact négatif sur la santé vésicale, l'eau doit avoir une concentration en arsenic supérieur à 300 µg/L (Navarro Silvera et Rohan, 2007). Le processus détaillé n'a pas encore été élucidé, mais l'inhibition indirecte de l'arsenic sur les enzymes possédant des groupements sulfhydriles altérerait, entre autres, le bon fonctionnement des enzymes antioxydantes (Letasiova et al., 2012).

Par la suite, soulignons l'obésité, engendrée entre autres par la sédentarité, qui va générer au niveau du tissu graisseux une quantité importante d'adipokines qui viendront chambouler la régulation de nombreux facteurs inflammatoires (Lee et al., 2015; Noguchi, Liss et Parsons, 2015). De plus, des études récentes ont démontré que l'acide lysophosphatidique, un phospholipide sécrété entre autres par les adipocytes, active l'initiation tumorale du cancer de la vessie (Kataoka et al., 2015; Xu et al., 2016).

Finalement, les infections urinaires répétitives, causées entre autres par *Escherichia coli*, rapatriant une grande quantité de cellules immunitaires pour éliminer et réparer les cellules urothéliales touchées, favorisent par le fait même des erreurs de réparation de

l'ADN (Nesi, Nobili, Cai, Caini et Santi, 2015). Soulignons que tous les facteurs mentionnés sont non seulement des facteurs de risques pour le cancer de la vessie, mais constituent également des stimulateurs de l'inflammation chronique.

1.1.2 Les traitements actuels

La décision quant aux choix des traitements à utiliser est généralement prise en fonction d'un critère majeur : est-ce que la tumeur est sous forme invasive ou non? En premier lieu, lorsque la tumeur est sous une forme non invasive, c'est-à-dire que la progression tumorale n'a pas encore atteint la couche musculaire, mais bien seulement l'urothélium, la chirurgie par résection transurétrale demeure la première option (Canadian Cancer Statistics 2019). Par la suite, si le volume superficiel de la tumeur est plus ou moins important, s'ensuivra une cystectomie partielle, segmentaire ou radicale (Berdik, 2017). De plus, l'immunothérapie est une option de traitement additionnel à la chirurgie lorsqu'il y a un risque de récurrence. Dans le cas du cancer de la vessie, c'est le vaccin Bacille Calmette-Guérin (BCG) qui est le plus sélectionné (DeGeorge, Holt et Hodges, 2017; Perez-Jacoiste Asin et al., 2014). Celui-ci est à la base d'un vaccin utilisé pour immuniser la population contre la tuberculose (Kowalewicz-Kulbat et Loch, 2017). Puisque les vaccins ont comme faculté première de stimuler le système immunitaire, et que dans certains cas où les cellules cancéreuses prolifèrent en passant sous le radar de celui-ci, il s'agit d'un traitement reconnu et approuvé mondialement depuis plus de 40 ans (Fuge, Vasdev, Allchorne et Green, 2015). Malheureusement, il ne s'agit pas d'un traitement infaillible, il y a donc possibilité d'utiliser la chimiothérapie intravésicale comme adjuvant au vaccin BCG ou bien comme alternative. L'agent choisi est majoritairement de la Mitomycine introduite par sonde urinaire suite à la chirurgie (Martinez Rodriguez, Buisan Rueda et Ibarz, 2017).

Pour ce qui est de l'immunothérapie, plusieurs nouveaux traitements sont en cours de développement, notamment des anticorps visant soit le récepteur « Programmed Death-1 » (PD-1) ou bien son ligand (PD-L1) (Yu et Rao, 2019). En effet, suite à une

surstimulation des lymphocytes T, comme dans le cas d'inflammation chronique menant au développement tumoral, ceux-ci vont subir une détérioration de leurs fonctions. Ce phénomène est appelé épuisement immunitaire (Wherry et Kurachi, 2015). Lorsque le lymphocyte T est dans cet état, il exprime à sa surface PD-1 qui se liera avec PD-L1 se retrouvant à la surface de cellules cancéreuses. Cette liaison inhibe la cytotoxicité des lymphocytes T, tout comme leur production de cytokines (Zhou et al., 2017). Malheureusement, ce type de traitement, étant très ciblé, semble agir sur une minorité de patients (Wang et al., 2018; Zhou et al., 2017).

En deuxième lieu, lorsque le cancer est sous une forme invasive, c'est-à-dire qu'il s'est propagé minimalement jusqu'à la couche musculaire, la chirurgie est encore une fois la première option à consentir (Canadian Cancer Statistics 2019). En plus de la chirurgie, la chimiothérapie systémique, injectée par voie intraveineuse, peut être proposée comme néoadjuvant ou adjuvant lorsqu'il y a un risque de propagation aux tissus voisins ou lorsque la propagation locale ou à distance a été diagnostiquée. Les agents chimiothérapeutiques les plus utilisés lors d'un traitement systémique sont le cisplatine en combinaison avec soit de la méthotrexate, la vinblastine ou la doxorubicine (Martinez Rodriguez et al., 2017). Et finalement, de la radiothérapie externe peut être administrée en même temps que les agents chimiothérapeutiques suivant la chirurgie (Canadian Cancer Statistics 2019). Il y a également la possibilité de faire appel à la radiothérapie comme traitement palliatif pour soulager les symptômes lorsque le cancer est à un stade avancé.

1.2 Le développement tumoral du CUV

1.2.1 La vessie

La vessie est un organe ayant comme rôle l'accumulation de l'urine produite par les reins, acheminée par les uretères, et à son évacuation via l'urètre contrôlé par le sphincter urétral (Andersson et Arner, 2004). La muqueuse de la vessie est un épithélium unique à cet organe, soit l'urothélium, qui ressemble à des cellules en forme de parapluie,

superposées de manière à former 6 à 7 couches d'épaisseurs. Celles-ci possèdent une très forte affinité l'une pour l'autre afin de résister à l'environnement hostile de la vessie, mais aussi à son remodelage constant (Sui, Rothery, Dupont, Fry et Severs, 2002). Ces cellules urothéliales offrent une perméabilité complète, une défense primaire contre les pathogènes et une grande communication cellulaire permettant l'activation des fibres sensorielles (Lazzeri, 2006). Toujours dans la muqueuse et succédant l'urothélium, le chorion possède une couche superficielle contenant les vaisseaux sanguins ainsi qu'une couche profonde élastique permettant l'adaptation de la conformation de la vessie vis-à-vis son contenu (Merrill, Gonzalez, Girard et Vizzard, 2016). Par la suite, il y a la musculuse qui est composée d'une couche musculaire longitudinale interne et de deux couches circulaires externes formant ainsi le muscle Détrusor. Finalement, la musculuse est recouverte de l'adventice composé majoritairement de tissus conjonctifs (Birder et Andersson, 2013).

Comme mentionné plus haut, la tumeur est sous une forme non invasive lorsqu'elle traverse la muqueuse, mais aussitôt qu'elle commence à envahir la musculuse elle atteint un stade invasif (Berdik, 2017). De manière générale, les tumeurs Tis, Ta et T1 désignent des tumeurs non invasives; le stade Tis concerne une tumeur *in situ* signifiant qu'elle se développe seulement au niveau de l'urothélium et est de forme plate; le stade Ta désigne une tumeur volumineuse, mais toujours au niveau de l'urothélium; le stade T1 concerne une tumeur qui envahit les différentes couches de chorions comme l'illustre la **Figure 1.1** (Knowles et Hurst, 2015). Pour ce qui est des stades T2, T3 et T4 ils désignent les stades invasifs; le stade T2a est le stade où la tumeur pénètre la première couche de la musculuse, tandis que T2b est celui où la tumeur pénètre la deuxième couche musculaire; le stade T3 désigne une invasion des tissus conjonctifs et périphériques; finalement, le stade T4 concerne une atteinte des organes avoisinants comme la prostate ou l'utérus (Berdik, 2017; Knowles et Hurst, 2015).

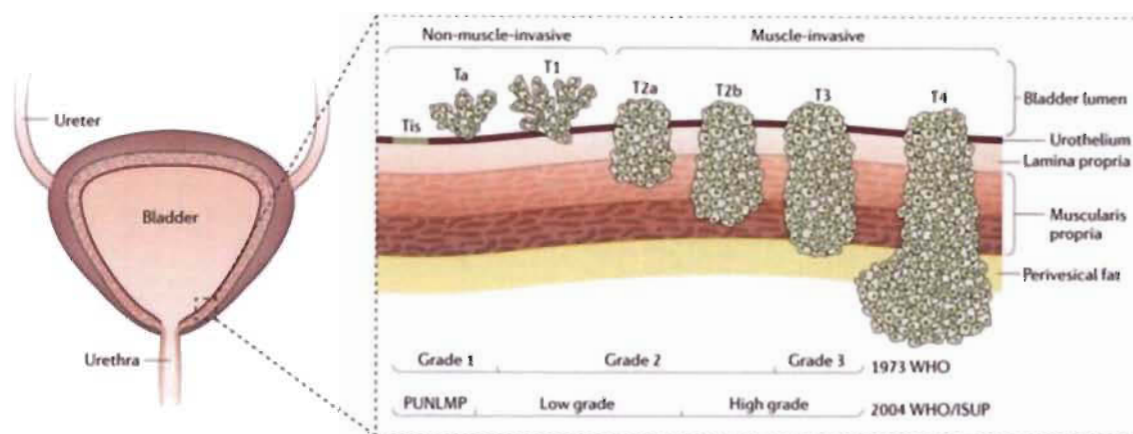


Figure 1.1 Illustration de la progression tumorale au sein des différentes composantes de la paroi vésicale selon les différents stades. (Sanli et al., 2017)

1.2.2 Initiation tumorale

La vessie est à la base un organe excréteur qui permet l'accumulation de l'urine produite par les reins et par le fait même de certains déchets nuisibles (Fry et Vahabi, 2016). Puisqu'il est relié par l'environnement extérieur via l'urètre, il est également la porte d'entrée de plusieurs microbes comme des bactéries. L'urothélium est donc en contact avec plusieurs éléments irritants tout au long d'une vie. Ces éléments vont tranquillement induire une inflammation chronique affectant l'épithélium transitionnel. Le processus d'initiation et de progression tumorale vésicale précis n'a pas encore été démystifié totalement puisqu'une foule de facteurs semble intervenir dans ce processus comme le sexe ou bien les habitudes de vie. Cependant, il implique clairement un dysfonctionnement du système immunitaire (Thompson, Siref, Feloney, Hauke et Agrawal, 2015). En effet, un des facteurs déterminants associés à l'agressivité métastatique ainsi qu'à la récurrence tumorale est l'inflammation chronique (Fernandes et al., 2015; Shinko, Diakos, Clarke et Charles, 2017; Sui, Lei, Chen, Xie et Li, 2017). Plusieurs facteurs irritants comme le tabac, les cystites et les infections urinaires sont connus pour entretenir une inflammation au niveau de la muqueuse vésicale, ce qui augmente grandement le risque de développement tumoral (Kantor et al., 1984; La Vecchia, Negri, D'Avanzo, Savoldelli et Franceschi, 1991).

Les irritants mentionnés vont entraîner une libération importante de médiateurs inflammatoires entraînant par le fait même une TEM (Zhang, Mao et Sun, 2019). En général, la TEM consiste à une transition de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses subissant une modification de leurs propriétés adhésives et dégradant la lame basale de l'épithélium (Sipos et Galamb, 2012). Cette transition est permise grâce à plusieurs types cellulaires comme les cellules « Natural Killer » (NK), les fibroblastes, les lymphocytes T, mais surtout grâce aux cellules épithéliales (ici urothéliales) et aux macrophages associés aux tumeurs (MAT) (Thompson et al., 2015). Ces deux derniers sont les acteurs principaux permettant l'initiation et la progression tumorale (Zhang et al., 2019). Effectivement, les cellules urothéliales endommagées seront soit détruites par apoptose, par exemple via Caspase-1 ayant comme substrat une interleukine (IL), soit l'IL-1 β , qui est sécrété par des macrophages pro-inflammatoires M ϕ -1 activés, ou bien seront réparées (Creagh, Conroy et Martin, 2003). Ces réparations entraînent des modifications du cycle cellulaire normal des cellules de l'urothélium; en les forçant à se réparer ou bien à se diviser d'une manière trop rapide, qui se fait entre 6 et 12 mois, nous forçons les erreurs lors de la réplication de l'ADN (Pinto-Leite et al., 2014). Ceci pousse à une désactivation de la transcription des gènes de type suppresseurs de tumeurs, comme «Tumor protein 53» (TP53), Rétinoblastome 1 (RB1) ou «Phosphatase and Tensin homolog » (PTEN), qui normalement empêchent les cellules endommagées de se diviser (Knowles, 2007; Pinto-Leite et al., 2014; Staack, Hayward, Baskin et Cunha, 2005). Par chance, notre système immunitaire détecte et détruit ce genre de cellules endommagées, mais parfois suite à d'autres mutations, celui-ci ne reconnaît plus les cellules cancéreuses comme étant dangereuses. Le système immunitaire ne devient plus apte à contrer les cellules cancéreuses puisqu'elles perdent, entre autres, l'expression des antigènes associés aux tumeurs et/ou elles sous-expriment les «Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A et B» (MICA) nécessaires à la lyse cellulaire par les cellules NK (El Hage, Abouzahr-Rifai, Meslin, Mami-Chouaib et Chouaib, 2008; Ferrari de Andrade et al., 2018).

1.2.3 Inflammation chronique et progression tumorale

L'inflammation chronique favorisant l'échange de facteurs pro-inflammatoires forme un microenvironnement inflammatoire, et par le fait même, entraîne la progression tumorale (Sui et al., 2017). Celui-ci est composé de plusieurs types de cellules immunitaires comme mentionnées plus haut.

La communication au sein du système immunitaire est très complexe puisqu'à chaque détection d'intrus ou de cellule endommagée au sein du corps humain, il doit y avoir une réaction adéquate, rapide, mais aussi un retour à la normale. Pour ce faire, il existe une foule de facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoire qui forme un équilibre immunitaire (Sanjabi, Zenewicz, Kamanaka et Flavell, 2009). Cet équilibre est brisé rapidement lorsqu'une surcharge de travail est demandée aux cellules immunitaires. Le premier réflex est de détruire ou stopper la division cellulaire et, pour y arriver, il y a plusieurs facteurs pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), l'IL-6, l'interféron gamma (INF γ) et les LPS qui seront le sujet abordé dans les sous-sections suivantes. Par la suite, il y a automatiquement la contre-réponse pour favoriser un retour à la normale du système inflammatoire. Si un débalancement survient, un choc systémique peut s'ensuivre comme dans les réactions anaphylactiques ou bien les septicémies, démontrant une suractivation du système inflammatoire pouvant entraîner la mort (Chaudhry et al., 2013). Parmi, les facteurs anti-inflammatoires permettant un retour à la normale, notons entre autres l'IL-4 et IL-10.

1.2.3.1 TNF α

Un des médiateurs pro-inflammatoire le plus abordé tout au long de cette étude est la cytokine TNF α . Celle-ci est une actrice très importante dans l'initiation et la progression tumorale (Thompson et al., 2015). À la base, cette cytokine est sécrétée, entre autres, par des M ϕ -1 lorsque ceux-ci sont activés par IL-1, INF γ ou LPS (Poh et Ernst, 2018). Par la suite, TNF α va se lier à son récepteur transmembranaire (TNFR1) qui va activer le

complexe protéique inhibiteur kappa-Kinase (I κ K), comme illustré à la **Figure 1.2** (Balkwill, 2006). Celui-ci, va aller phosphoryler la protéine de séquestration I κ β et ainsi entraîner deux réactions : la libération de la protéine « Nuclear factor-kappa B » (NF κ B) ainsi que l'ubiquitination de p-I κ B. Lorsque NF κ B est libéré, il sera transloqué à l'intérieur du noyau pour ainsi aller se lier à son promoteur et activer la transcription d'une foule de gènes favorisant la survie cellulaire (Balkwill, 2006).

En premier lieu, un des gènes clés activés sera le gène de la protéine TNF α , elle-même, ce qui perpétuera la communication, et par le fait même l'activation entre les leucocytes intra-tumoraux et les cellules cancéreuses (Collart, Baeuerle et Vassalli, 1990). En deuxième lieu, il y a le gène de la protéine métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9), un autre facteur très important pour la progression tumorale en provoquant l'invasion et la métastase tumorale (He, 1996). En effet, celle-ci permet la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant ainsi l'invasion locale et à distance des cellules tumorales (Gong et al., 2016). En troisième lieu, il y a transcription des gènes activant l'angiogenèse, dont celui de la cytokine IL-8 (Karashima et al., 2003; Rottner, Freyssinet et Martinez, 2009). Cette cytokine pro-inflammatoire joue un rôle important dans la progression tumorale, notamment grâce à l'activation de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales (Alfaro et al., 2017). Cette cascade entraîne par le fait même une augmentation de la production de MMPs et de l'isoforme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) au sein du microenvironnement tumoral (Alfaro et al., 2017; Lechner, Lirk et Rieder, 2005). NF κ B semble donc être une cible pour freiner le développement tumoral, par contre, il régule aussi la sécrétion d'IL-1 β lors d'infection bactérienne (Baud et Karin, 2009; Greten et al., 2007).

Notons que TNF α joue également un rôle important au niveau de l'induction de l'apoptose. En effet, lors de la dissociation de NF κ B, s'il y a recrutement de la protéine « Fas-Associated protein with Death Domain » (FAD) ainsi que des caspases 8 et 10 dans le noyau, il y aura alors apoptose chez la cellule ciblée (Elmore, 2007).

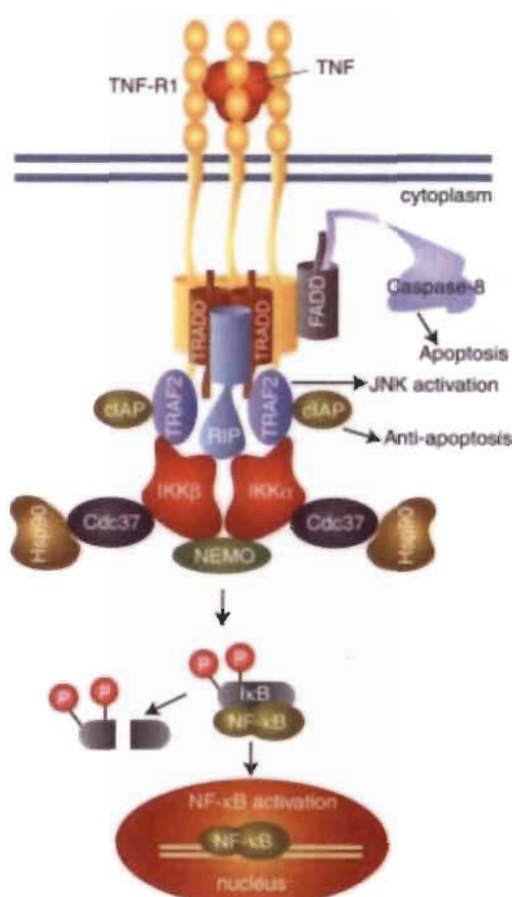


Figure 1.2 Illustration de la voie de signalisation TNF α /TNFR1/ NF κ B. (Chen et Goeddel, 2002)

1.2.3.2 *iNOS/NO*

L'*iNOS* est encodé par le gène *NOS2* qui est sous régulation de différents signaux, notamment par NF κ B activé (Morris et al., 2003). Cette protéine est une enzyme catalysant la production d'oxyde nitrique (NO) à partir d'une réaction ayant comme substrat le L-arginine. Comme l'indique son nom, l'*iNOS* peut être induite par le TNF α , mais aussi par l'INF γ et les LPS (Jenkins et al., 1995; Kostourou et al., 2011). La régulation de la production de NO via *iNOS* est encore un sujet d'actualité puisque la concentration en NO chez les patients atteints du CUV est un facteur déterminant de l'agressivité du cancer (Klotz et al., 1999; Sawicka, Lisowska, Kowal et Dlugosz, 2015). Effectivement, le NO est associé avec un mauvais pronostic au niveau du CUV puisque

50% des patients atteints par ce cancer présentent un taux anormalement élevé en NO au niveau de la vessie (Sandes et al., 2012; Viallard et Larrivee, 2017). Au fait, le NO est reconnu pour maintenir ou augmenter la croissance tumorale déjà établie à trois niveaux: a) il est l'un des médiateurs du processus angiogénique permettant la croissance de la tumeur grâce à l'apport en nutriments et en oxygène; b) il peut fonctionner comme facteur de survie pour certaines cellules tumorales; et c) il peut inhiber la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur (Burke, Sullivan, Giles et Glynn, 2013; Cassini-Vieira et al., 2015; Hussain et al., 2008; Pekarova et al., 2011). Dans le cas du cancer de la vessie, il semble que le NO soit un facteur de survie essentiel, car lorsqu'il est inhibé, la prolifération cellulaire, la croissance tumorale et les propriétés liées à l'invasion ont été réduites (Belgorosky et al., 2014).

1.2.3.3 IL-6

L'IL-6 est un autre facteur pro-inflammatoire important dans le contexte du CUV puisqu'il est un inducteur de la motilité cellulaire et par le fait même un acteur important dans la progression tumorale (Sui et al., 2017). En résumé, la voie de signalisation engendrée par liaison d'IL-6 et de son récepteur IL6R implique l'activation des protéines « Janus Kinase » (JAK) qui vont phosphoryler la protéine appelée signal transducteur et activateur de la transcription 3 (STAT3), provoquant ainsi leur dimérisation et leur translocation dans le noyau. STAT3, se liant à son promoteur, va activer la transcription de plusieurs gènes résultant en l'augmentation de la motilité via, entre autres, la surexpression de vimentine (Bharti, Dey et Mandal, 2016). Cette protéine fait partie de la famille des filaments intermédiaires du cytosquelette cellulaire chez les mammifères. L'invasion est également induite par l'IL-6 grâce à la transcription de MMP-1, qui comme MMP-9, est une protéine dégradant la matrice extracellulaire (Itoh et al., 2006). De plus, l'exposition prolongée à l'IL-6 peut mener à la surexpression des gènes anti-apoptotiques comme « *B-cell lymphoma 2* » (BCL-2) (Thompson et al., 2015).

La majorité des voies de signalisation intracellulaires étant entrecroisée, complexe et dynamique, celle de l'IL-6 en fait partie. Effectivement, une autre cible de l'activation du récepteur d'IL-6 est NFκB, qui possède la faculté d'activer la transcription de gènes comme TNFα, MMP-9 mais aussi celui de l'IL-6 lui-même (Son et al., 2008). Cette boucle d'activation présente chez les macrophages et les cellules tumorales est ainsi entretenue grâce aux cytokines TNFα et IL-6 et l'activation de facteurs de transcription NFκB et STAT3, créant ainsi un microenvironnement tumoral propice à l'invasion et à l'agressivité tumorale (Ji, He, Regev et Struhl, 2019; Zhu, Shen et Xu, 2012).

1.2.3.4 INFγ

L'INFγ est une autre cytokine d'intérêt, car elle est produite lors de l'inflammation chronique qui s'établit dans le microenvironnement tumoral (Fernandes et al., 2015; Shinko et al., 2017; Sui et al., 2017). Au niveau moléculaire, l'INFγ se lie d'abord à son récepteur l'INFR et entraîne l'activation des protéines JAK2 responsables de la phosphorylation de STAT1 et de sa dimérisation (Hu et Ivashkiv, 2009). Après sa dimérisation, il y a translocation dans le noyau et activation de la transcription de plusieurs gènes ayant une séquence d'ADN spécifique de reconnaissance à STAT1. Aux niveaux cellulaire et fonctionnel, l'INFγ agirait sur plusieurs types cellulaires et coordonnerait plusieurs processus immunitaires et inflammatoires ayant un impact soit défavorable, soit favorable pour le développement et la progression tumorales (Mandai et al., 2016; Mojic, Takeda et Hayakawa, 2017). D'une part, lors d'une réponse inflammatoire aiguë, elle permettrait l'augmentation de la présentation d'antigènes tumoraux par les cellules dendritiques et les macrophages, l'habilité d'adhésion et d'encrage chez les leucocytes mais surtout l'induction de l'activité cytotoxique des macrophages, des cellules NK et des cellules T cytotoxiques. D'autre part, de données récentes indiquent qu'une exposition chronique à l'INFγ mènerait à l'apparition des clones tumoraux résistants aux attaques du système immunitaire (Mandai et al., 2016; Mojic et al., 2017). L'activation de la voie JAK2/STAT1 par l'INFγ est également connue pour induire la surproduction de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), qui renforce l'adhésion des cellules

cancéreuses aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, facilitant ainsi le processus métastatique (Sundar Rajan, Laurent, Verdier et Duperray, 2017; Walter, Look, Tidwell, Roswit et Holtzman, 1997). Enfin, l'INF γ va également induire la production d'iNOS et par le fait même la production en NO (Blanchette, Jaramillo et Olivier, 2003; Kang, Koo, Lee, Yun-Choi et Chang, 1999).

1.2.3.5 LPS

Comme mentionné plus haut, les infections bactériennes répétitives du tractus génito-urinaire génèrent une inflammation chronique et favorisent le développement du CUV (Nesi et al., 2015). Fait important à noter, la majorité des infections urinaires chez les patients souffrant du CUV sont causées par des bactéries Gram négatives (Vodvarka et Jancova, 1988). Les LPS sont des endotoxines retrouvées dans la membrane externe de bactéries Gram négatives qui sont reconnues par un récepteur spécifique, le « *Toll-Like receptor 4* » (TLR4), exprimé notamment, sur la membrane plasmique des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules de l'urothélium (LaRue, Ayari, Bergeron et Fradet, 2013; Li, Yin, et al., 2017). Les LPS, reconnues au niveau de l'urothélium en premier lieu, déclenchent donc une cascade pro-inflammatoire afin d'éliminer l'intrus détecté par le TLR4 (Li, Yin, et al., 2017). Les interactions LPS/TLR4 sont connues pour induire la translocation de NF κ B dans le noyau (Lai et al., 2017) ainsi que la production et la sécrétion de nombreux facteurs pro-inflammatoires, notamment le TNF α et l'IL-1 par les M ϕ -1 activés (Petes et al., 2017). Similairement à l'INF γ et le TNF α , les LPS vont être utilisés dans le cadre de cette étude pour sa capacité à activer la production d'iNOS et par le fait même pour mimer le contexte d'inflammation chronique menant au développement tumoral (Plum, Huang, Grabensee, Schror et Meyer-Kirchrath, 2002). Le NO produit par iNOS est un médiateur omniprésent dans un large éventail d'états inflammatoires, notamment une tumeur en développement, et reflète le degré d'une réponse inflammatoire, fournissant ainsi une mesure du processus inflammatoire.

1.3 La problématique

La problématique entourant le CUV n'est pas seulement le nombre de personnes atteint par ce cancer, mais surtout sa récurrence qui s'élève à plus de 70 % selon certaines études épidémiologiques et clinicopathologiques (Martinez Rodriguez et al., 2017; Smith et Zaharoff, 2016). De plus, ce taux de récurrence élevé fait du CUV le cancer le plus coûteux par patient (Kwan, Garren, Nielsen et Tang, 2018). Un lien important est à faire entre cette récurrence et le fait que le CUV est le 3^e cancer avec le plus haut taux de mutation (Erdmann, 2017). L'activation constante du cycle cellulaire des cellules de la paroi vésicale causée par l'inflammation chronique est soupçonnée d'entraîner un taux d'altération génomique important favorisant un développement tumoral agressif chez le CUV. Effectivement, le cancer de la vessie se situe en 3^e position derrière le cancer du poumon et du mélanome en termes de mutation du génome (Kandoth et al., 2013). Avec un taux de survie après 5 ans du diagnostic de seulement 36 %, nous nous sommes donc penchés sur la problématique du CUV avec l'idée en tête qu'il y a un manque important d'alternatives thérapeutiques pour ce type de cancer (Canadian Cancer Statistics 2019).

1.4 L'hypothèse

Nous croyons que la boucle d'activation déclenchée par les cellules de l'urothélium et soutenue par les leucocytes intra-tumoraux est la source de plusieurs cas de cancers très agressifs et difficiles à traiter. Donc, en prenant en considération que l'inflammation chronique incite l'initiation et la progression tumorales grâce à une communication entre les leucocytes intra-tumoraux et les cellules de l'urothélium, nous croyons qu'en inhibant cette communication au sein du microenvironnement tumoral, nous pourrions élaborer des nouvelles thérapies pour les cancers difficiles à traiter.

1.4.1 Études précédentes : les DABs

1.4.1.1 Première génération

Pour arriver à valider cette hypothèse, notre équipe de recherche a établi une collaboration avec l'équipe du Dr. Gervais Bérubé, qui a d'abord procédé à plusieurs réactions chimiques à partir de l'acide *para*-aminobenzoïque (PABA) pour former plusieurs dérivés, appelés DABs. Les DABs de première génération fournis par le laboratoire du Dr. Bérubé ont fait l'objet d'une publication au sein de notre laboratoire (Hamelin-Morrisette et al., 2015). En résumé, nous avons confirmé une absence d'activité anti-inflammatoire du PABA, mais certains dérivés montraient une forte activité anti-inflammatoire. La molécule ayant démontré la plus grande activité anti-inflammatoire est la molécule AL-549 (**Figure 1.3**). Son énorme potentiel anticancéreux a été mis en évidence par sa capacité à inhiber significativement : 1) les voies de signalisation $\text{INF}\gamma/\text{STAT1}$ et $\text{IL-6}/\text{STAT3}$; 2) l'expression de marqueurs inflammatoires comme les protéines cluster de différenciation 40 (CD40) et du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II); et 3) la mobilité cellulaire ainsi que l'expression de NO par les macrophages pro-inflammatoires $\text{M}\phi\text{-1}$ activés.

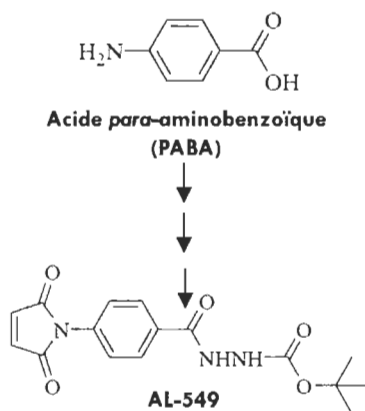


Figure 1.3 Illustration de la molécule du PABA et d'un de ses dérivés, l'AL-549.

Dans une autre publication en cours de rédaction, la molécule AL-549 a été utilisée dans un modèle *in vivo* du cancer de la vessie (Girouard J, et al 2019, Translational Research, accepté). Cette étude a permis de mettre en évidence l'activité anticancéreuse et anti-métastatique d'AL-549 (**Figure 1.4**).

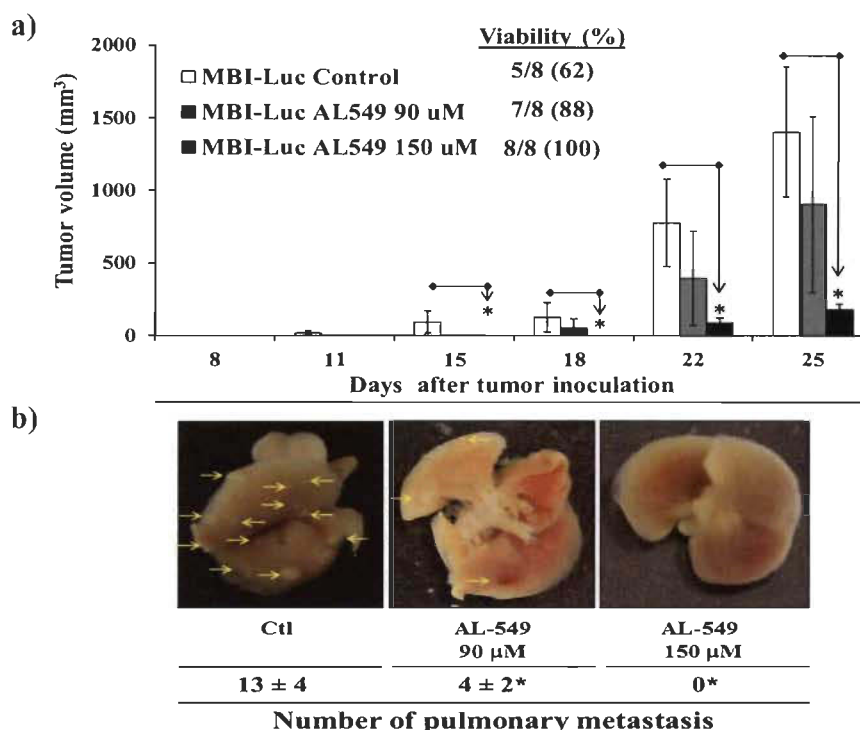


Figure 1.4 Résultats *in vivo* de la viabilité, de la grosseur de tumeurs et du nombre de métastases chez les souris C57Bl/6J inoculées avec les cellules MB49-I.

a) Les cellules invasives MB49-I (3×10^5 cellules) ont été implantées dans le flanc de souris C57Bl/6J (n=8) et après 4 jour, elles ont été traitées avec des injections intrapéritonéales de PBS (ctrl) ou d'AL-549 à 90 μM et 150 μM. Les injections ont été répétées aux jours 7, 10, 14, 17, 21 et 24. **b)** Vue macroscopique de métastases à la surface de poumons du groupe témoin et du groupe de souris traitées avec AL-549 à 90 μM. Les flèches jaunes indiquent une métastase.

Comme illustré à la **Figure 1.4**, les souris témoins injectées avec la solution tampon phosphate salin (PBS) d'une manière périodique présentaient un volume tumoral d'environ 1300 mm³ et un taux de viabilité de 62 % après 25 jours suivant l'inoculation des cellules cancéreuses. D'autre part, le groupe de souris traitées avec une solution d'AL-549 à 150 μM montrait un taux de viabilité de 100% ainsi qu'un volume tumoral d'environ 200 mm³. De plus, toujours lors de la même étude, alors que des métastases pulmonaires

étaient détectables de manière macroscopique dans le groupe de souris témoins (13 ± 4), aucune métastase macroscopique n'a été décelée dans les poumons du groupe de souris traitées avec la solution d'AL-549 à $150 \mu\text{M}$.

1.4.1.2 Deuxième génération

Les recherches ont continué, car AL-549, à très forte dose, semblait légèrement cytotoxique et que son mécanisme d'action restait toujours à être élucidé. Puisque cette molécule de première génération était celle qui possédait la plus grande efficacité anti-inflammatoire, des modifications ont été apportées au sein de celle-ci afin de l'optimiser (**Figure 1.5**) (Bérubé, Reyes-Moreno, 2017). Différentes sections de la molécule ont été visées afin d'observer une perte ou un gain au niveau de son pouvoir inhibiteur. À la suite de plusieurs expériences, décrit un peu plus loin dans ce mémoire, la molécule dénommée ML-28 semblait être la molécule ayant un effet légèrement supérieur à AL-549 avec une cytotoxicité moindre.

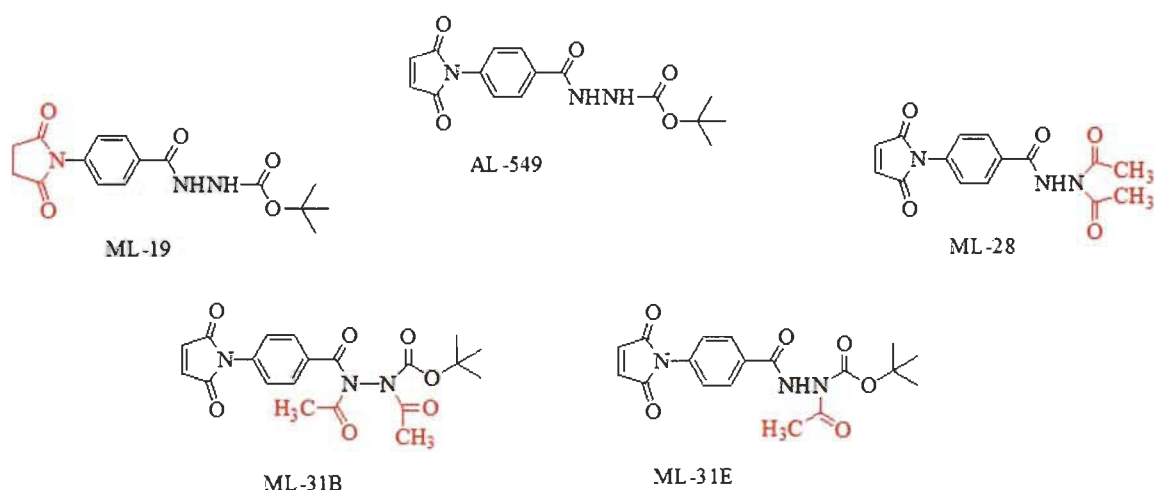


Figure 1.5 Illustration de la molécule AL-549 et de ses dérivés : ML-19 (AL-549 hydrogéné), ML-31B (AL-549 di-acétylé), ML-31E (AL-549 mono-acétylé) et ML-28 (AL-549 déprotégé et di-acétylé).

1.5 Objectifs

Malgré les nombreux résultats intéressants des dernières études effectuées, certains aspects restent à être élucidés :

- 1) Premièrement, plusieurs modifications cellulaires ont été observées lors des recherches précédentes avec l'utilisation de AL-549 sur les macrophages humains pro-inflammatoires comme son effet inhibiteur sur certaines voies de signalisation ou encore sur l'expression de facteurs pro-inflammatoires. Par contre, l'origine de toutes ces altérations causées par les DABs n'a pas encore été découverte. Mon premier objectif consistait donc à déterminer le mécanisme d'action précis de cette molécule.
- 2) Deuxièmement, nous avons observé un problème non négligeable pour la poursuite de nos recherches; à très forte dose d'AL-549, c'est-à-dire en haut de 50 μ M, cette molécule est cytotoxique tels que confirmé par des tests de prolifération cellulaire (**Annexe A**). Souhaitant pouvoir développer une alternative au traitement de chimiothérapie visant à détruire toutes les cellules à division rapide, nous visons plutôt un effet cytostatique, c'est-à-dire en mettre un frein à la prolifération cellulaire. Mon deuxième objectif était donc de déterminer si d'autres DABs de deuxième génération présentaient une activité inhibitrice accrue sur la prolifération cellulaire et la réponse pro-tumorale de certaines cytokines/facteurs pro-inflammatoires tout en étant moins cytotoxiques pour les cellules tumorales du CUV et les macrophages.

CHAPITRE II

APPROCHES EXPÉRIMENTALES PRIVILÉGIÉES ET MÉTHODOLOGIES

2.1 Culture cellulaire

Les différents tests biologiques ont été effectués avec des lignées cellulaires du CUV murin mâle MB49 et MB49-I, du CUV humain T24 et 5637, et de monocyte humain THP-1. Les cellules ont été maintenues dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS), 1 mM de pyruvate de sodium, 10 mM d'acide 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonique (HEPES) et de 50 mg/mL de Gentamycine (correspond à RPMI 10% FBS). Les cellules ont été maintenues dans un incubateur avec une atmosphère à 37°C, humidifiée et à 5% de dioxyde de carbone (CO₂).

La lignée cellulaire MB49 provient d'un carcinome urothélial de la vessie induit chimiquement dans les souris mâle C57BL/6J et est largement utilisée pour des expériences *in vivo* et *in vitro*, tandis que la lignée cellulaire MB49-I provient des MB49, mais plus invasive et agressive suite à plusieurs passages *in vivo* (Fabris et al., 2012; Lodillinsky et al., 2009; Summerhayes et Franks, 1979). Concernant la lignée T24, il s'agit également d'une lignée du CUV largement utilisée, mais cette fois-ci provenant d'un sujet humain de sexe féminin (O'Toole, Perlmann, Unsgaard, Moberger et Edsmyr, 1972). Les cellules 5637 sont également une lignée humaine et invasive du CUV qui est utilisée depuis plusieurs années, mais qui provient d'un sujet masculin (Bender, Pao et Jones, 1998). Finalement, les cellules THP-1 sont un modèle de monocyte humain dérivé d'une leucémie monocyttaire et qui peut être aisément différencié en macrophages grâce à un traitement avec un ester de phorbol (PMA à 50 ng/mL) et utilisé en coculture afin de stimuler une réponse inflammatoire de la part des cellules cancéreuses (Bosshart et Heinzelmann, 2016).

2.2 Immunodétection des protéines d'intérêts

En premier lieu, les cellules MB49, MB49-I et T24 (50×10^3 cellules/puit) ont été activées avec du TNF α (25 ng/mL), de l'IL-6 (100 ng/mL) ou bien avec du PBS (solution témoin) pendant 5, 15 et 30 minutes. Par la suite, les cellules ont été lysées et analysées par un immunobuvardage de type Western, comme décrit précédemment (Dallagi et al., 2015). Sommairement, les protéines ont été séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) et transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes ont été incubées, dans un premier temps, avec des anticorps de souris polyclonaux contre p-I κ B et des anticorps de lapin polyclonaux contre p-STAT3 (dilution 1:2000) pendant toute une nuit à 4 °C. Dans un deuxième temps, les membranes ont été réincubées avec des anticorps de chèvre anti-lapin et anti-souris (dilution 1:3000) couplés à la peroxydase de raifort (HRP) pendant 1 h à température pièce. Dans tous les cas, les protéines ont été visualisées grâce à l'ajout du réactif «SuperSignal» qui réagit à l'HRP en émettant un signal de chimiluminescence (Thermo Fisher Scientific). Ces membranes ont par la suite été découpées pour être encore une fois incubées avec des anticorps contre STAT3 ou β -actine (dilution 1:2000).

Dans une deuxième série d'expériences, les cellules tumorales ont été prétraitées avec différentes solutions contenant les DABs à 10, 30 et 50 μ M pendant 30 minutes avant l'activation avec TNF α (25 ng/mL) et IL-6 (100 ng/mL).

Également, les cellules MB49 et MB49-I (50×10^3 cellules/puit) ont fait l'objet d'un test supplémentaire pour la détection de la protéine iNOS. Ces cellules ont été prétraitées avec du diméthyle sulfoxyde (DMSO) comme témoin ou avec AL-549 ou d'autres DABs à 30 μ M pendant 30 minutes et activées avec du PBS ou TNF α (25 ng/mL) et IL-6 (100 ng/mL) pendant 24 et 48h. L'immunodétection de la protéine iNOS a été réalisée comme décrit plus haut, à l'aide des anticorps de lapin polyclonaux anti iNOS (dilution 1:2000) et des anticorps de chèvre anti-lapin (dilution 1:3000) couplés à la HRP.

2.3 Test de réactif de Griess pour l'évaluation de la production de NO

Les cellules MB49 et MB49-I (50×10^3 cellules/puit) ont été prétraitées avec du DMSO comme témoin ou les DABs à $30 \mu\text{M}$ pendant 30 minutes et ensuite, elles ont été activées avec $\text{TNF}\alpha$ (25 ng/mL) ou IL-6 (100 ng/mL) pendant 24 h. Pour évaluer la quantité de NO produit, le milieu des puits a été récolté et une aliquote de celui-ci a été mélangé avec un volume égale d'une solution contenant de l'acide sulfanilique et d'une solution de N-(1-naphthyl)ethylenediamine (Réactif de Griess Life technologies), comme décrit précédemment (Belgorosky et al., 2014). Ce réactif se couple à l'ion nitrite (NO_2^-) présent dans le surnageant, qui est obtenu lors de l'oxydation spontanée de NO, et produit une coloration rosée dont l'intensité a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biotek, synergy HT) à 548 nm .

2.4 Gène rapporteur de la luciférase

Pour tenter d'élucider une partie du mécanisme d'AL-549, les cellules MB49-I (75×10^3 cellules/puit) ont été transfectées avec $0,5 \mu\text{g}$ du vecteur PathDetect $\text{NF}\kappa\text{B}$ *cis*-reporting system (Agilent Technologies) à l'aide de $1,5 \mu\text{L}$ de lipofectamine2000 par puits selon le protocole du fabricant (Thermo Fisher). Après 36 h de transfection, le milieu de culture a été changé pour du RPMI 0 % FBS et pendant 3 h. Par la suite, les cellules ont été prétraitées pendant 1 h avec du DMSO comme témoin ou AL-549 à 10 et $30 \mu\text{M}$, suivi d'une activation de 5 h avec du $\text{TNF}\alpha$ à 10 et 50 ng/mL . Les échantillons, disposés dans une plaque de 96 puits, ont été ajoutés de luciférine et immédiatement lus dans un spectrophotomètre (Biotek, synergy HT) qui quantifiera le nombre de photons produit suite à la réaction entre la luciférine et la luciférase. (**Figure 3.3**)

2.5 Test d'invasion

Ce test d'invasion a été effectué comme décrit précédemment pour étudier l'invasion des cellules tumorales en interaction avec les macrophages (Dufresne et al., 2011). Le montage comporte un filtre (chambre de Boyden) inséré au sein d'un puits de plaque de culture (24-puits). Les macrophages sont ensemencés dans le puits de plaque de culture. La membrane du filtre présente des pores de 8 μm et est recouverte d'une matrice extracellulaire artificielle (Matrigel). Les cellules tumorales sont alors ensemencées au-dessus de cette matrice et migrent à travers celle-ci pour atteindre le fond du filtre. Brièvement, une solution de Matrigel (dilution 1:50) a été déposée sur le filtre et laissée polymériser pendant 24 h à 37°C. En parallèle, une suspension des cellules THP-1 (50×10^3 cellules/puits) dans du RPMI 0 % FBS a été déposée dans un puits de plaque de culture (24-puits) en présence de PMA à 50 ng/mL pour induire la différenciation des monocytes en macrophages. Les macrophages ont été cultivés dans un milieu de culture seul (macrophage M0) ou supplémenté avec 100 ng/mL de LPS et 25 U/mL d'IFN γ pour induire un phénotype pro-inflammatoire M ϕ -1. Les cellules T24 ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 30 μM pendant 30 minutes. Pour chaque traitement, une suspension des cellules T24 (35×10^3 cellules/insert) dans du RPMI 0% FBS a alors été déposée par-dessus un filtre contenant du Matrigel et le filtre déposé à l'intérieur d'un puits de plaque de culture contenant de macrophages M0 ou M ϕ -1. Après 48 h d'incubation, le Matrigel a été enlevé, les filtres ont été lavés avec du PBS et les cellules ont ensuite été fixées à l'aide de formaldéhyde pendant 15 minutes à température pièce. Les filtres ont été décollés de l'insert et montés sur une lame d'histologie avec du ProLong Glass (Thermo Fisher) et du Hoeschst (dilution 1:8000). Finalement, les cellules T24 invasives ont été comptées au microscope fluorescent inversé.

2.6 Test de motilité « Scratch »

Ce test mime la réparation d'une blessure par motilité cellulaire (Menon, Ronkina, Schwermann, Kotlyarov et Gaestel, 2009). Lors de cette expérience, les cellules T24 (75×10^3 cellules/puit) ont été mises en plaque et 24 h plus tard, à l'aide d'un embout p200, une ligne droite a été tracée, comme précédemment décrit (Dallagi et al., 2015; Hamelin-Morrisette et al., 2015). Les cellules T24 ont alors été prétraitées avec du DMSO comme témoin ou AL-549 à $10 \mu\text{M}$ pendant 1 h et par la suite activées avec du IL-6 (100 ng/mL). Pour déterminer le niveau de migration à l'intérieur de la zone absente de cellules (blessure), des photos ont été prises au temps 0 et 24 h avec un microscope fluorescent inversé. (**Figure 3.4**)

2.7 Test de prolifération/survie cellulaire par MTT

Le test de prolifération cellulaire au MTT permet de déterminer l'activité mitochondriale. De manière relative, il permet également de déterminer le nombre de cellules vivantes dans un puits de plaque de culture sous diverses conditions grâce à une courbe de tendance pré-déterminée. Elle a été réalisée comme décrit précédemment (Hamelin-Morrisette et al., 2015). En bref, les cellules MB49-I (50×10^3 cellules/puit) ont été prétraitées avec du DMSO ou les DABs à différentes concentrations pendant 1 heure et ensuite, elles ont été remises dans un milieu de culture de base RPMI 5 % FBS pendant 18 heures. Pour évaluer le nombre de cellules de chaque puits, $10 \mu\text{L}$ d'une solution de 5 mg/mL de sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a été ajouté à chaque puits. Le réactif a alors été réduit par la succinate déshydrogénase des mitochondries en formazan. Après 3 heures d'incubation à 37°C , le milieu de culture a été aspiré et remplacé par une solution à base d'isopropanol afin de dissoudre le précipité de formazan. La densité optique a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre à 580 nm . (**Figure 3.8**)

2.8 Modèle de tumeur de cancer murin de la vessie

Pour ce qui est du modèle de croissance tumorale *in vivo*, il a été développé en injectant les cellules du CUV murin MB49-I ($2,3 \times 10^5$ dans 100 μL de PBS) par voie sous-cutanée au niveau du flanc des souris mâle C57BL/6J. Soulignons que le modèle orthotopique a été développé, mais dû au grand nombre d'échecs de développement tumoral, il n'a pas été utilisé dans cette expérience. Par la suite, 7 jours suivant l'inoculation, trois groupes de 10 souris portant des tumeurs MB49-I ont reçu chacun par voie intra-péritonéale, une injection d'une solution de PBS, d'AL-549 ou de ML-28, toutes les deux à une concentration de 150 μM . Les injections ont été répétées à tous les 2-3 jours. Les mesures du poids des souris, à l'aide d'une balance, et du volume des tumeurs, à l'aide d'un micromètre, ont été effectuées à tous les 2-3 jours. Au jour 21 suivant l'inoculation des cellules tumorales, les souris ont été euthanasiées et certains organes et les tumeurs ont été disséqués et conservés dans la formaline tamponnée à 10%.

2.9 Coloration HES

Une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) a été effectuée sur des coupes histologiques de différents organes et tumeurs de souris comme décrit précédemment (Chan, 2014). Les organes et tumeurs récoltés ont d'abord été mis dans un circulateur possédant 14 bains afin de déshydrater, éclaircir et imprégner les tissus. Les 10 premiers bains se font à 37 °C et durent entre 30 minutes et 2 h. Les premières 7 étapes servent alors à la déshydratation des organes de manière croissante à l'aide d'alcool de 70 à 100% tandis que les trois derniers sont composés de xylène afin d'éclaircir les organes. Les 4 derniers bains servent à imprégner graduellement les tissus avec une solution de paraffine, maintenue à 60 °C. La prochaine étape est l'inclusion et elle consiste à enrober de paraffine les organes imprégnés dans un moule. Une fois les moules formés, on procède à la coupe des tissus au microtome à une épaisseur de 5 μm . Chaque tranche de tissus est alors submergée successivement dans un bain d'alcool et d'eau, tempérée à 65°C afin de permettre la fixation sur la lame de verre.

Enfin, la coloration trichromatique HES consiste à plonger les lames d'histologie selon des moments précis dans différentes solutions. Les trois premiers bains sont composés de xylène afin d'enlever le surplus de paraffine. Les 5 prochains bains sont formés d'alcool de 100% à 70% afin d'enlever progressivement les résidus de xylène. Ensuite, la coloration à l'hématoxyline, qui dure deux minutes, est précédée et suivie d'un rinçage à l'eau courante. Par la suite, un trempage à l'eau ammoniacale va permettre à la coloration d'hématoxyline de devenir bleu. Après un rinçage à l'eau courante, il y a une étape de coloration à l'éosine d'une durée d'environ 4 minutes, suivie d'un rinçage à l'eau courante. Avant l'étape de coloration au safran, les lames sont déshydratées dans un bain d'alcool à 100%. La coloration au safran dure environ 10 minutes et sera responsable de la coloration jaunâtre. Pour bien fixer les colorations, un bain à l'alcool 100% et un autre de xylène sont effectués. Finalement, la dernière étape consiste à déposer environ 10 µL de permount (ThermoFisher) pour fixer une lamelle à chaque lame d'histologie, comme décrit (Cardiff, Miller et Munn, 2014).

L'hématoxyline donne la coloration bleutée dans les noyaux. Cette coloration bleue du noyau est due au caractère cationique de l'hématoxyline, qui se lie donc aux éléments négatifs du noyau tel que les acides nucléiques (Chan, 2014). L'éosine, qui donne une coloration rosée, est un colorant anionique qui se lie alors aux éléments du cytoplasme chargés positivement (Cardiff et al., 2014). En réagissant avec le collagène contenu dans les différents types de tissus conjonctifs, le safran, lui, donnera une coloration jaunâtre à chaque coupe de tissu montée sur la lame d'histologie (Cribier et Grosshans, 1995). **(Figure 3.13)**

2.10 Analyse statistique

À l'exception des études *in vivo*, les résultats pour tous les tests mentionnés proviennent de 3 expériences indépendantes et correspondent à la moyenne \pm l'écart type. Les résultats ont été analysés par la méthode one-way ANOVA suivie du test Bonferroni en utilisant le logiciel PRISM 7 (GraphPad, San Diego, CA). En utilisant un intervalle de confiance de 95%, une valeur de p plus petite que 0,05 indique statistiquement une différence significative.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 L'effet modulateur d'AL-549 sur la voie de signalisation $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$ et son impact au niveau de la régulation du système iNOS/NO dans les cellules MB49-I et T24

L'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$, via la phosphorylation d' $\text{I}\kappa\beta$, chez le CUV, est un facteur déterminant lors de l'initiation et de la progression tumorale (Sui et al., 2017; Thompson et al., 2015). Cette voie a donc été investiguée chez nos modèles de CUV murin MB49-I et de CUV humain T24 après un prétraitement avec AL-549 (**Figure 3.1**). Autant dans les cellules MB49-I que dans les cellules T24, nous n'avons observé pratiquement aucune phosphorylation d' $\text{I}\kappa\beta$ dans les cellules témoins non activées avec $\text{TNF}\alpha$. Par contre, une forte phosphorylation d' $\text{I}\kappa\beta$ a été observée lors d'une activation au $\text{TNF}\alpha$ de 5 minutes à 50 ng/mL. Une inhibition faible mais significative de la phosphorylation d' $\text{I}\kappa\beta$ a été observée avec des prétraitements de 30 minutes avec AL-549 à 10 μM . Une inhibition pratiquement complète de la phosphorylation est également observable lorsque les cellules ont été prétraitées avec AL-549 à une dose de 30 μM .

Par la suite, comme le démontre la **Figure 3.2 a**, une augmentation importante de l'expression protéique d'iNOS est induite dans les cellules MB49-I par une activation avec $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/mL) pendant 48 h. Pour être capable d'établir un lien entre l'expression d'iNOS et la concentration de NO, un test au réactif de Griess a été effectué (**Figure 3.2 b**). Pour ce qui est du test de la concentration en NO, une activation au $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/mL) pendant 24 h a été effectuée. Nos résultats indiquent une concentration basale en NO d'environ 11 μM dans les cellules témoins prétraitées avec du DMSO et activées avec du PBS. Par contre, dans les cellules prétraitées avec du DMSO et activées avec du $\text{TNF}\alpha$,

une concentration en NO aux alentours de 40 μM a été notée. Tout comme l'analyse d'expression d'iNOS, lorsque les cellules sont prétraitées pendant 30 minutes avec AL-549, on observe non seulement une inhibition de la production de NO dans les cellules témoins non activées, mais également dans les cellules activées avec du $\text{TNF}\alpha$. Ainsi, même les cellules activées et prétraitées expriment un niveau de NO en dessous du niveau basal des cellules témoins (**Figure 3.2 b**).

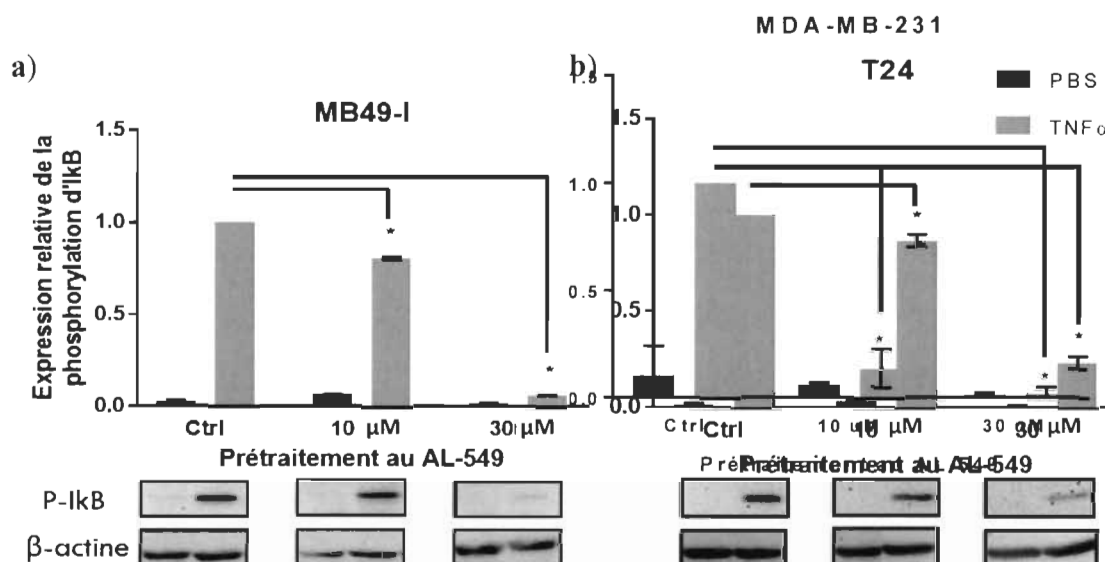


Figure 3.1 La modulation d'AL-549 sur la phosphorylation d'Iκβ induit par $\text{TNF}\alpha$ dans les cellules du CUV murin MB49-I et du CUV humain T24.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 μM pendant 30 minutes et ensuite activées pendant 5 minutes avec du PBS et du $\text{TNF}\alpha$ (25 ng/mL). L'immunodétection de ces molécules a été faite en utilisant les anticorps anti-p-Iκβ. **a)** Les cellules MB49-I. **b)** Les cellules T24. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots sont représentatifs de celles-ci.

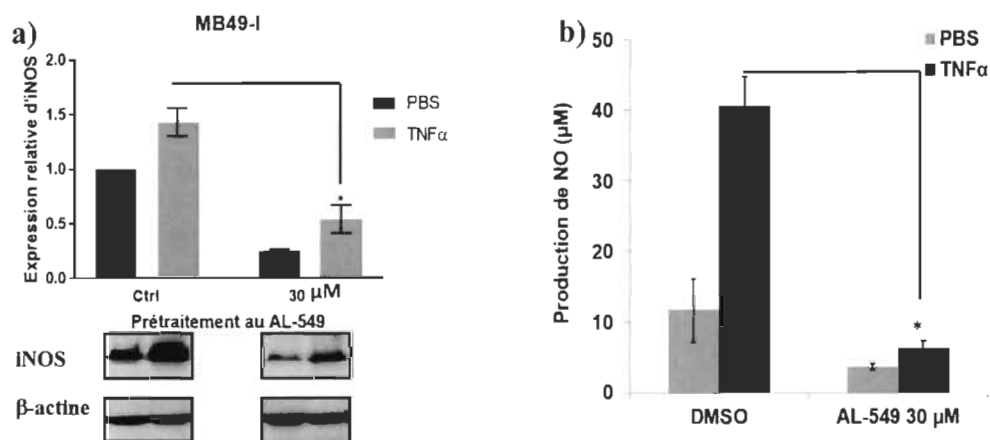


Figure 3.2 L'impact d'AL-549 sur la régulation du système iNOS/NO induit par TNFα dans les cellules MB49-I.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 30 μM pendant 30 minutes et ensuite activées avec du PBS, TNFα (50 ng/mL) 48h pour mesurer l'expression d'iNOS et pendant 24h pour la concentration en NO. L'immunodétection et le test de réactifs de Griess montrent que le AL-549 inhibe l'expression de **a)** iNOS et **b)** de NO comparativement aux cellules non prétraitées. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots sont représentatifs de celles-ci.

Le test d'expression de la luciférase sous le contrôle du facteur de transcription NFκB a été effectué pour confirmer non seulement l'activité inhibitrice d'AL-549 sur la voie de signalisation TNFα/NFκB, mais également au niveau de la régulation de l'expression génique induite par NFκB. Les cellules MB49-I transfectées avec le vecteur NFκB-Luciférase ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 10 et 30 μM et ensuite activées avec TNFα à 10 et 50 ng/mL avant de pouvoir quantifier l'activité de la luciférase (**Figure 3.3**). Les résultats de ce test démontrent qu'il y a une activité importante de la transcription du gène de la luciférase au niveau de cellules témoins prétraitées avec du DMSO mais nettement rehaussée de façon dose-dépendante dans les cellules activées avec du TNFα. De plus, cette analyse démontre d'une part l'effet inhibiteur d'AL-549 à une dose de 10 μM sur l'activité de la transcription du gène de la luciférase induite par une activation avec du TNFα à 50 ng/mL. Encore plus important, nos résultats démontrent qu'AL-549 à une dose de 30 μM induit une forte inhibition de la transcription du gène de la luciférase non seulement dans les cellules témoins prétraitées avec du DMSO mais également dans les cellules activées avec du TNFα, ramenant dans toutes les cellules une activité de la luciférase en dessous du niveau basal.

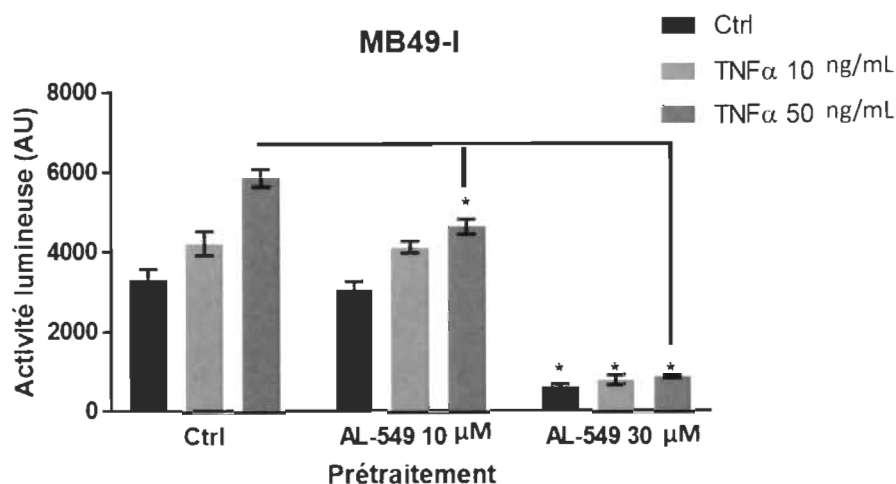


Figure 3.3 L'effet modulateur d'AL-549 au niveau de l'activation de la voie $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$ dans les cellules MB49-I.

Les cellules ont été transfectées avec un vecteur $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Luciférase. Elles ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 10 ou 30 μM pour 30 minutes et ensuite activées avec du PBS ou $\text{TNF}\alpha$ pendant 24h. Ces résultats montrent qu'AL-549 inhibe efficacement l'expression et l'activité de la luciférase induite à la suite d'activation de $\text{NF}\kappa\text{B}$ par $\text{TNF}\alpha$. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

3.2 L'action d'AL-549 sur l'activité invasive des cellules humaines T24 du cancer de la vessie

Des publications antérieures ont rapporté que l'augmentation du pouvoir invasif des cellules tumorales co-cultivées avec des macrophages $\text{M}\phi$ -1 dépend de la production de $\text{TNF}\alpha$ et de la régulation à la hausse de la synthèse de métalloprotéases matricielles induite par le $\text{TNF}\alpha$ (Hagemann et al., 2004; Hagemann et al., 2005). Ainsi, comme le $\text{TNF}\alpha$ est fortement exprimé par les macrophages $\text{M}\phi$ -1, nous avons démontré que le blocage du récepteur de $\text{TNF}\alpha$, le TNF-R1 , dans les cocultures de cellules T24/macrophages $\text{M}\phi$ -1 réduisait les capacités invasives des cellules T24, suggérant que les interactions $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ sont nécessaires pour soutenir le caractère invasif des cellules T24. Ainsi, comme nous l'avons décrit précédemment, nous avons constaté que le caractère invasif des cellules T24 était significativement accru lorsque co-incubées avec les macrophages $\text{M}\phi$ -1. Par contre, lorsque les cellules ont été prétraitées avec AL-549 à 30 μM , une inhibition significative en dessous du niveau basal est observée (**Figure 3.4**).

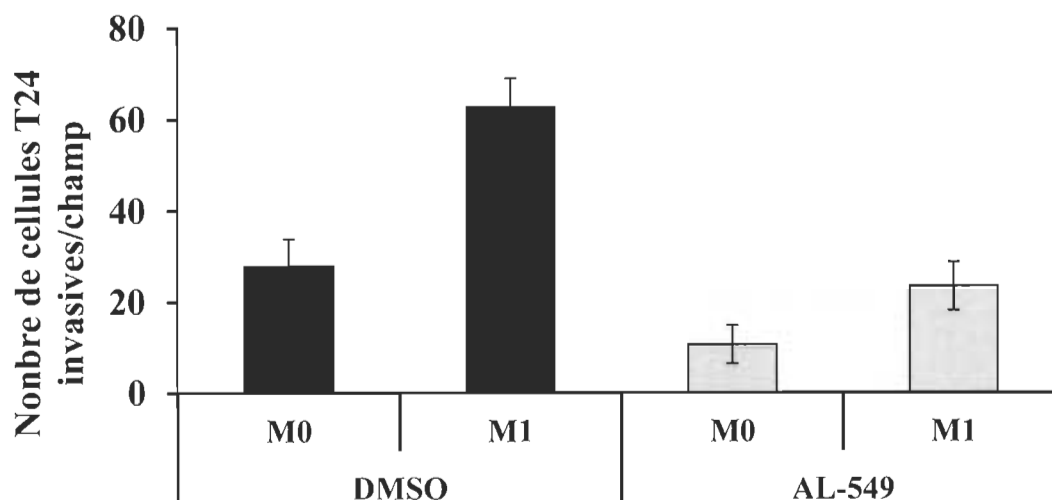


Figure 3.4 **Activité inhibitrice d'AL-549 sur l'invasion des cellules T24 en coculture avec les macrophages.**

Les cellules T24 ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 30 μ M pour 30 minutes. L'invasion des cellules T24 induite par la présence des macrophages M ϕ -I a été inhibée efficacement par un prétraitement avec AL-549 à 30 μ M. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

3.3 L'impact d'AL-549 sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 et de son effet sur la mobilité cellulaire des T24

L'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire IL-6/STAT3 dans les tumeurs du CUV est une des nombreuses caractéristiques déterminant l'agressivité tumorale (Sui et al., 2017; Thompson et al., 2015). Tout comme TNF α /NF κ B, cette voie a également été investiguée dans les cellules MB49-I et T24 à la suite d'un prétraitement avec AL-549 (**Figure 3.5**). Autant dans les cellules MB49-I que les cellules T24, nous avons observé une phosphorylation pratiquement nulle de STAT3 dans les cellules témoins non activées par IL-6. Par la suite, une forte phosphorylation de STAT3 est observée lors d'une activation de 15 minutes avec IL-6 à 100 ng/mL. Une inhibition significative de la phosphorylation de STAT3 est observable dans les deux modèles cellulaires avec des prétraitements de 30 minutes avec AL-549 à 10 μ M. De plus, une

inhibition pratiquement complète de la phosphorylation est observable lorsque les cellules ont été prétraitées avec AL-549 à 30 μ M.

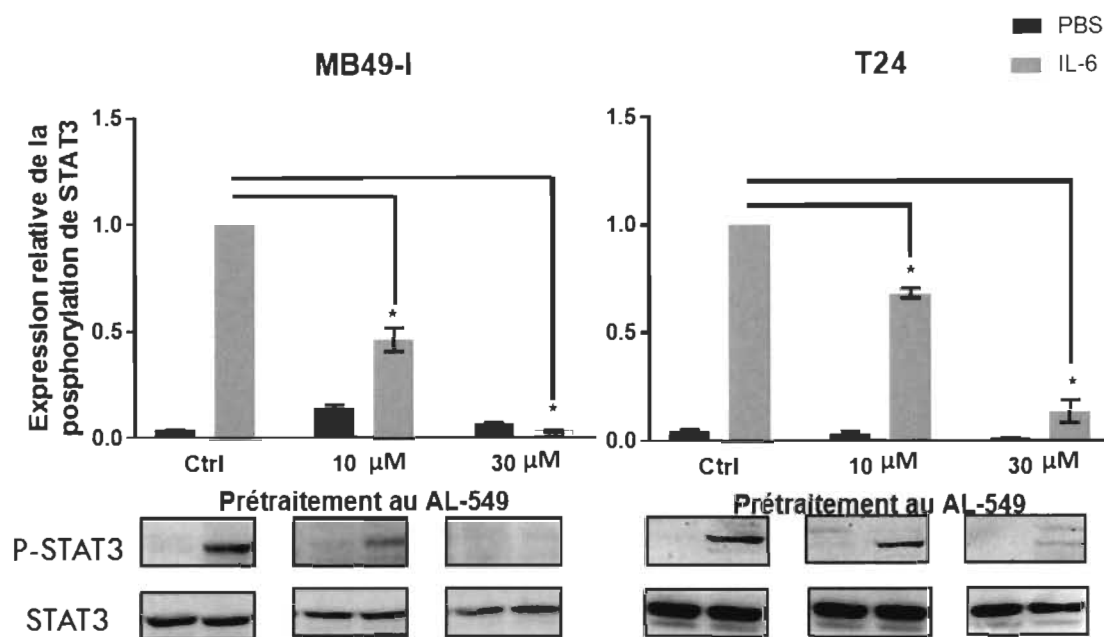


Figure 3.5 Effet modulateur d'AL-549 sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 dans les cellules MB49-I et T24.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 10 ou 30 μ M pendant 30 minutes et ensuite activées pendant 15 minutes avec du PBS ou IL-6 (100 ng/mL). AL-549 inhibe efficacement la voie de signalisation IL-6/STAT3 chez les cellules T24 et les MB49-I. L'immunodétection a été effectuée avec des anticorps anti-phospho-STAT3 et anti-STAT3. **a)** Les cellules MB49-I. **b)** Les cellules T24. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots sont représentatifs de celles-ci.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action d'AL-549 sur l'activation de la voie de signalisation IL-6/STAT3, nous avons procédé à un test de motilité cellulaire induite par IL-6 dans les cellules T24. Les cellules T24 en culture ont donc été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 10 μ M pendant 30 minutes avant la création d'une «blessure» à travers la monocouche cellulaire. Elles ont ensuite été activées avec du PBS ou IL-6 à 100 ng/mL pendant 48h (**Figure 3.6**). Les images de blessures prises au temps 0 indique que les zones absentes de cellules sont toutes de tailles comparables. Par contre, 48 h plus tard des différences importantes sont notables; la première colonne montre que sans activation à l'IL-6 la blessure s'est refermée légèrement; la deuxième colonne montre que les cellules ont pratiquement recouvert la blessure à la suite d'une activation avec IL-6 à

100 ng/mL; la dernière colonne démontre qu'un prétraitement avec AL-549 à 10 μ M pendant 30 minutes induit un arrêt de la motilité des cellules T24, il est capable d'inhiber la mobilité cellulaire comparable à nos cellules T24 non activées par IL-6.

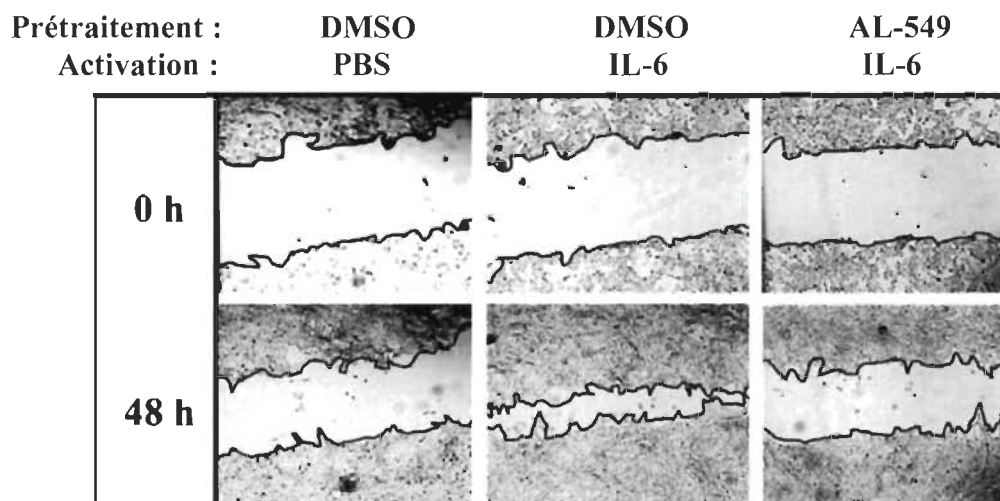


Figure 3.6 Effet modulateur d'AL-549 sur la motilité induite par IL-6 dans les cellules T24 du cancer humain du CUV.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou AL-549 à 10 μ M pendant 30 minutes et ensuite activées pendant 48 heures avec du PBS ou IL-6 (100 ng/mL). Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

3.4 Étude comparative de l'activité anti-inflammatoire d'AL-549 avec certaines DABs de 2e génération via la mesure de production en NO

Afin d'atteindre notre second objectif, soit celui de trouver un DAB plus efficace qu'AL-549, nous avons commencé par comparer l'efficacité des différents DABs synthétisés à inhiber la production de NO par les cellules MB49-I. Les cellules ont d'abord été prétraitées pendant 30 minutes avec du DMSO ou avec AL-549, ML-28, ML-19, ML-31E ou ML-31B à des doses de 10 ou 30 μ M (**Figure 3.7**). Par la suite, les cellules ont été activées avec de l'INF γ à 25 ng/mL et du LPS à 100 ng/mL. Afin de normaliser les valeurs de concentration en NO obtenues à chaque expérience, et tenir compte de cette variabilité, nous avons considéré la production en NO des cellules témoins activées comme le point de référence en lui attribuant la valeur de 100 %. Les résultats rapportés

à la **Figure 3.7** indiquent, d'une part, que les molécules ML-19, ML-31E et ML-31B sont moins efficaces que les molécules AL-549 et ML-28 à inhiber la production en NO et ce, même à une dose de 30 μ M. D'autre part, nos analyses statistiques indiquent que la molécule ML-28 inhibe significativement la production de NO de manière similaire sinon plus efficace qu'AL-549.

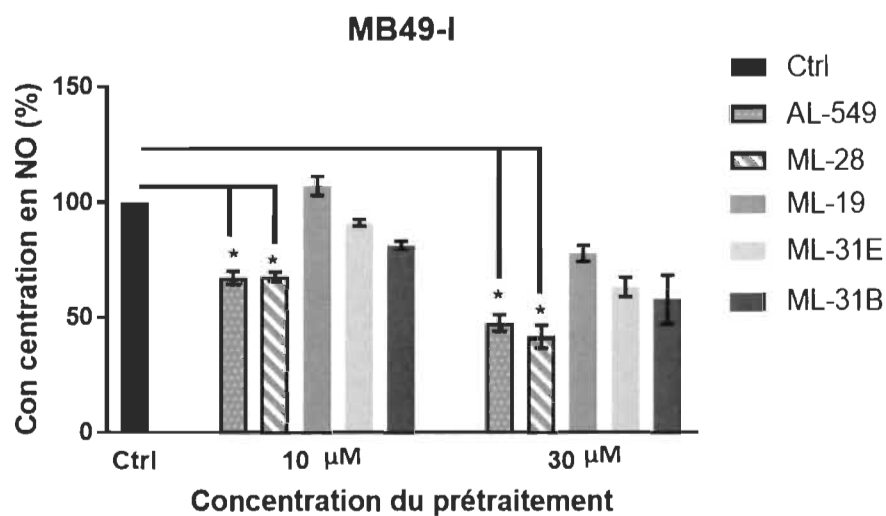


Figure 3.7 Production en NO induit par des signaux inflammatoires dans les cellules MB49-I prétraitées ou non avec différents DABs.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou des DABs à 10 ou 30 μ M pendant 30 minutes et ensuite activées avec du PBS ou de l'INF γ à 25 ng/mL et du LPS à 100 ng/mL. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

3.5 Effets des DABs sur la cytotoxicité des cellules MB49-I

Afin de déterminer si la molécule ML-28 était moins cytotoxique qu'AL-549, un test de prolifération cellulaire a été effectué (**Figure 3.8**). La procédure pour ce test consistait tout d'abord à effectuer un prétraitement pendant 1 h avec du DMSO, AL-549 ou ML-28 à des concentrations fixes de 20, 30, 40 et 50 μ M. Les tests de MTT ont été effectués après 24h d'incubation. Comme pour le test de NO, nous avons considéré la viabilité des cellules témoins traitées avec le DMSO comme le point de référence en lui attribuant la valeur de 100 %. Nos résultats démontrent que ML-28, même à une concentration de 50 μ M, est beaucoup moins cytotoxique, le nombre de cellules vivantes

étant plus élevée comparativement aux cellules prétraitées avec AL-549 (88 % versus 65 %). Cette différence entre les deux prétraitements est même très significative à partir d'une dose de 20 μ M (99 % versus 87 %).

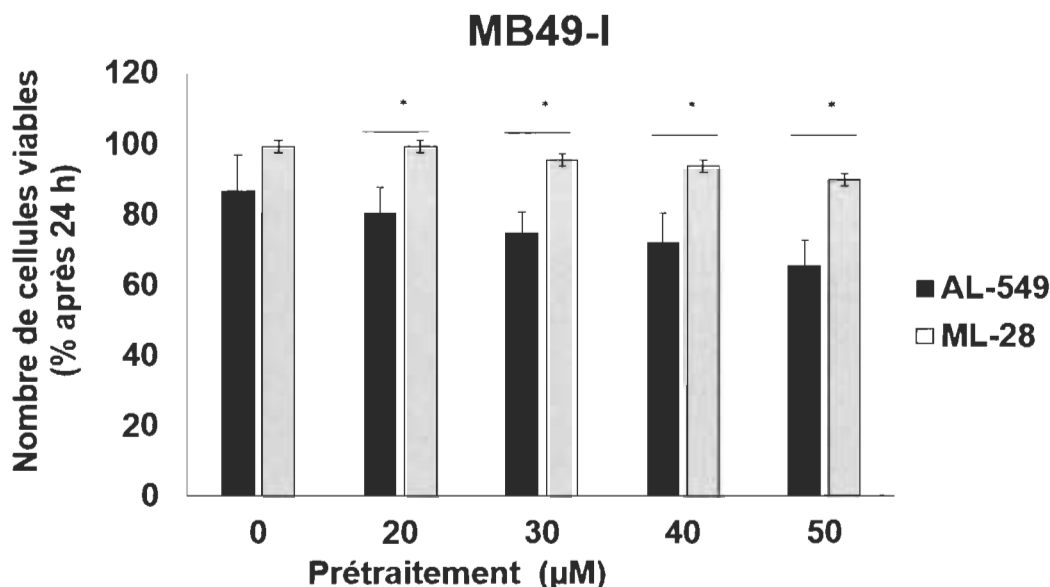


Figure 3.8 Le % de cellules viables par rapport au type de prétraitement selon différentes concentrations de DABs chez les MB49-I.

Les cellules ont été prétraitées avec du PBS ou des DABs à 20, 30, 40 ou 50 μ M pendant 1 heure. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots sont représentatifs de celles-ci.

3.6 Vérification de la capacité inhibitrice de ML-28 sur l'activation des voies de signalisation TNF α /NF κ B et IL-6/STAT3 dans les cellules murines (MB49-I) et humaines (5637) du cancer de la vessie

Puisque parmi les DABs de 2^e génération, ML-28 s'est avéré moins toxique mais plus efficace à inhiber la production de NO, nous nous sommes proposés de déterminer son effet régulateur sur la phosphorylation d'I κ B et de STAT3. Pour le second objectif, c'est plutôt les 5637 qui ont été utilisées comme modèle cellulaire humain du CUV. Pour ce qui est de la phosphorylation d'I κ B, les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou du ML-28 à 10 et 30 μ M pendant 30 minutes, avant d'être activées avec du PBS ou du TNF α à 50 ng/mL (**Figure 3.9**). Nos résultats indiquent que ML-28, à une dose de 10 μ M, inhibe faiblement mais de manière significative la phosphorylation d'I κ B. L'effet

inhibiteur de ML-28 est plus évident à une dose de 30 μ M, avec un niveau d'inhibition de près de 95 % sur les cellules MB49-I et de 50 % sur les cellules 5637.

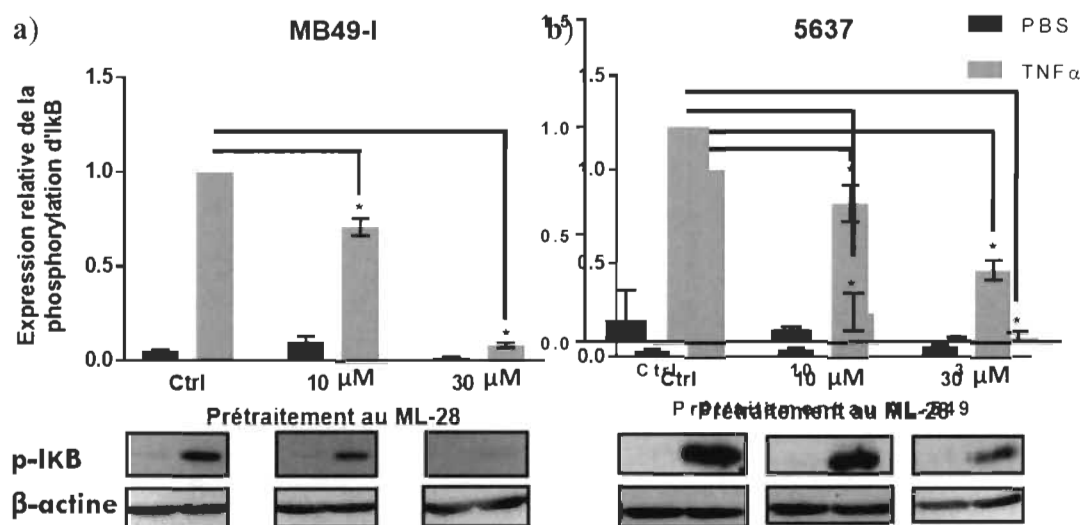


Figure 3.9 La modulation de ML-28 sur la phosphorylation d'IκB induit par TNFα dans les cellules du CUV murin MB49-I et du CUV humain 5637.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou ML-28 à 10 ou 30 μ M pendant 30 minutes et ensuite activées pendant 5 minutes avec du PBS ou TNFα (50 ng/mL). L'immunodétection de ces molécules a été faite en utilisant les anticorps anti-p-IκB et anti-β-actine. **a)** Les cellules MB49-I **b)** Les cellules 5637. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots sont représentatifs de celles-ci.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons évalué l'effet de ML-28 sur l'activation de la voie de signalisation IL-6/STAT3. Les cellules ont donc été prétraitées avec du DMSO ou du ML-28 à 10 et 30 μ M pendant 30 minutes, avant d'être activées avec du PBS ou de l'IL-6 à 100 ng/mL. Tel que montré à la **Figure 3.10**, ML-28 exerce un effet inhibiteur sur la phosphorylation de STAT3 similaire à celui sur la phosphorylation d'IκB : à une dose de 10 μ M, ML-28 inhibe faiblement mais de manière significative la phosphorylation d'IκB. Par contre, à une dose de 30 μ M, le niveau d'inhibition a été évalué à 95 % sur les cellules MB49-I et à 85 % sur les cellules 5637.

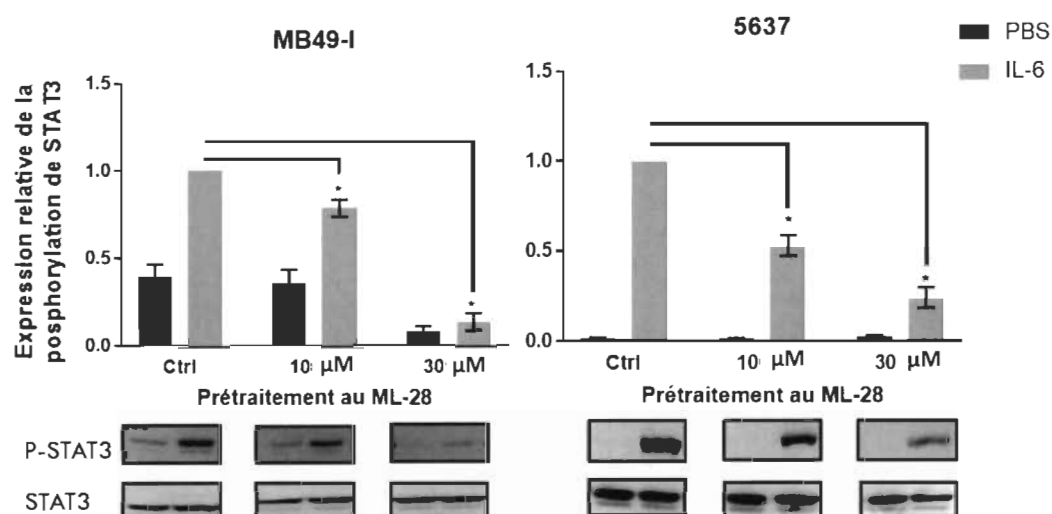


Figure 3.10 Effet modulateur de ML-28 sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 dans les cellules MB49-I et 5637.

Les cellules ont été prétraitées avec du DMSO ou ML-28 à 10 ou 30 μM pendant 30 minutes et ensuite activées pendant 15 minutes avec du PBS ou IL-6 (100 ng/mL). L'immunodétection a été effectuée avec des anticorps anti-phospho-STAT3 et anti-STAT3. **a)** Les cellules MB49-I. **b)** Les cellules 5637. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots sont représentatifs de celles-ci.

3.7 Étude comparative de l'activité inhibitrice d'AL-549 avec ML-28 sur la croissance des tumeurs dérivées des cellules MB49-I implantées de façon ectopique sur les flancs des souris C57BL/6J

Après avoir validé son potentiel anticancéreux à l'aide des modèles *in vitro*, une validation de son potentiel anticancéreux *in vivo* était de mise. La molécule ML-28 a donc été injectée par voie intra-péritonéale à une concentration de 150 μM , tout comme AL-549, de manière périodique 7 jours suivant l'inoculation du cancer. Cette expérience a été effectuée afin de pouvoir comparer, de manière quantitative, l'effet de ces deux DABs sur un modèle animal.

Les souris ($n=30$) ont été euthanasiées 21 jours après l'inoculation et leurs organes et tumeurs ont été récoltés. Les résultats obtenus montrent une baisse du volume tumoral d'un peu plus de 2000 mm^3 entre les souris du groupe contrôle et celles traitées avec AL-

549. De plus, il y a une baisse supplémentaire d'environ 200 mm³ après 20 jours d'inoculation entre AL-549 et ML-28 (**Figure 3.11**).

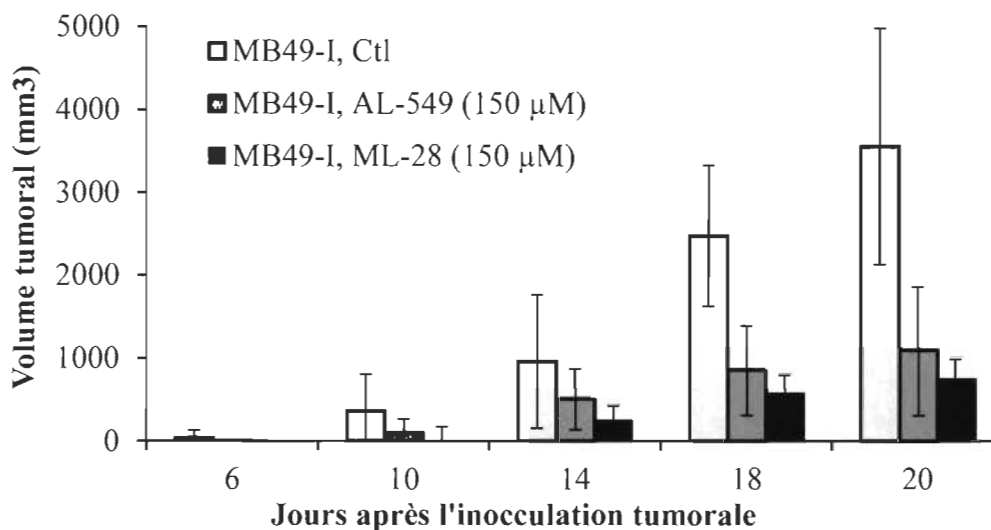


Figure 3.11 Volume tumoral de tumeurs MB49-I ectopiques chez les souris C57BL/6J traitées ou non avec AL-549 ou ML-28.

Les souris (n=10) ont été inoculées avec $2,3 \times 10^5$ cellules de MB49-I au niveau du flanc. Après 4 jours, elles ont été traitées avec du PBS, AL-549 ou ML-28 à 150 µM. Les injections ont été répétées aux jours 7, 10, 14, 17 et 21. Le volume tumoral a été noté au jour 6, 10, 14, 18 et 20. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de 10 souris par condition.

De manière macroscopique, il nous était possible d'observer le nombre de métastases ayant proliféré sur les poumons (**Figure 3.12**). Sur le résultat présenté, c'est 11 métastases pulmonaires que l'on a retrouvées sur les poumons d'une des souris contrôles (n=10). Pour ce qui est des souris traitées avec soit AL-549 (n=10) ou ML-28 (n=10) à 150 µM, aucune métastase pulmonaire n'était visible à l'œil nu comme le montrent les photos suivantes.



Figure 3.12 Poumons de souris C57BL/6J portant des tumeurs MB49-I ectopiques et traitée ou non avec AL-549 ou ML-28.

Les souris (n=10) ont été inoculées avec $2,3 \times 10^5$ cellules de MB49-I au niveau du flanc. Après 4 jours, elles ont été traitées avec du PBS, AL-549 ou ML-28 à 150 μM . Les injections ont été répétées aux jours 7, 10, 14, 17 et 21. Vue macroscopique de métastases à la surface de poumons du groupe contrôle et du groupe de souris traitées.

Par la suite, toujours au niveau de la même expérience, une coloration HES a été effectuée avec les poumons des souris pour tenter d'observer, cette fois-ci, les métastases à l'aide d'un microscope (**Figure 3.13**). Avec un grossissement de 40x, il a été possible d'observer au moins deux foyers métastatiques avec une simple prise de vue d'un poumon d'une souris du groupe témoin. Pour ce qui est des souris traitées avec AL-549 à 150 μM , aucune métastase pulmonaire n'a été découverte comme les résultats précédemment obtenus. De façon similaire, les souris traitées avec ML-28 à 150 μM ne présentaient également aucun foyer, comme le démontre les photos présentées à la **Figure 3.13**.

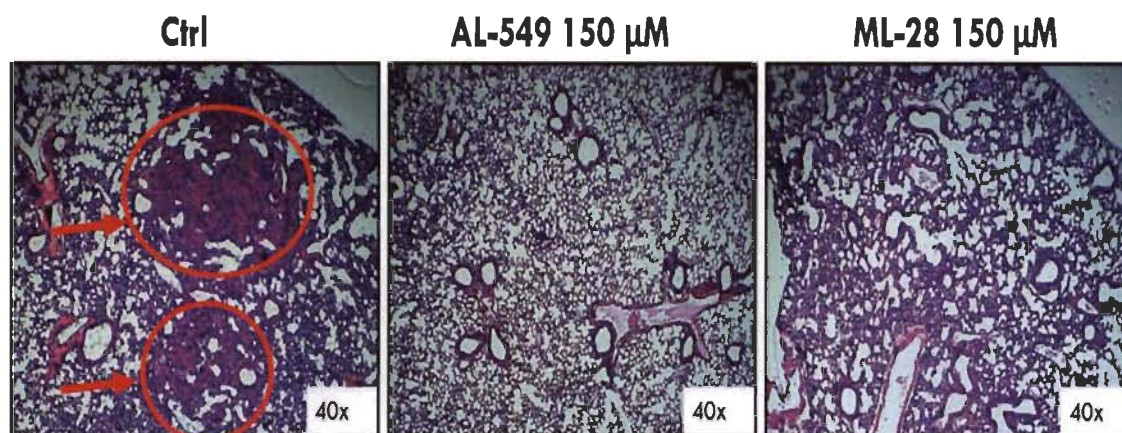


Figure 3.13 Coloration HES des poumons de souris C57BL/6J portant des tumeurs MB49-I ectopiques et traitées ou non avec AL-549 ou ML-28.

Les souris ($n=10$) ont été inoculées avec $2,3 \times 10^5$ cellules de MB49-I au niveau du flanc. Après 4 jours, elles ont été traitées avec du PBS, AL-549 ou ML-28 à $150 \mu\text{M}$. Les injections ont été répétées aux jours 7, 10, 14, 17 et 21. Vue microscopique de poumons du groupe contrôle et des groupes de souris traitées.

Il est important de noter que préalablement à ces tests, une expérience consistant à déterminer la toxicité des molécules AL-549 et ML-28 dans notre modèle *in vivo* de souris C57BL/6J a été effectuée. Effectivement, les foies des souris C57BL/6J ont été récoltés dans le but de détecter ou non la présence de cellules hépatiques affectées par nos molécules (**Figure 3.14**). L'analyse de ces coupes histologiques démontre qu'il n'y a eu aucune altération des cellules hépatiques, et ce, même à une concentration de $150 \mu\text{M}$. Nous avons donc pu conclure, grâce au test *in vivo*, que la molécule ML-28 épargne les cellules hépatocytaires et possède un pouvoir anticancéreux légèrement plus efficace qu'AL-549.

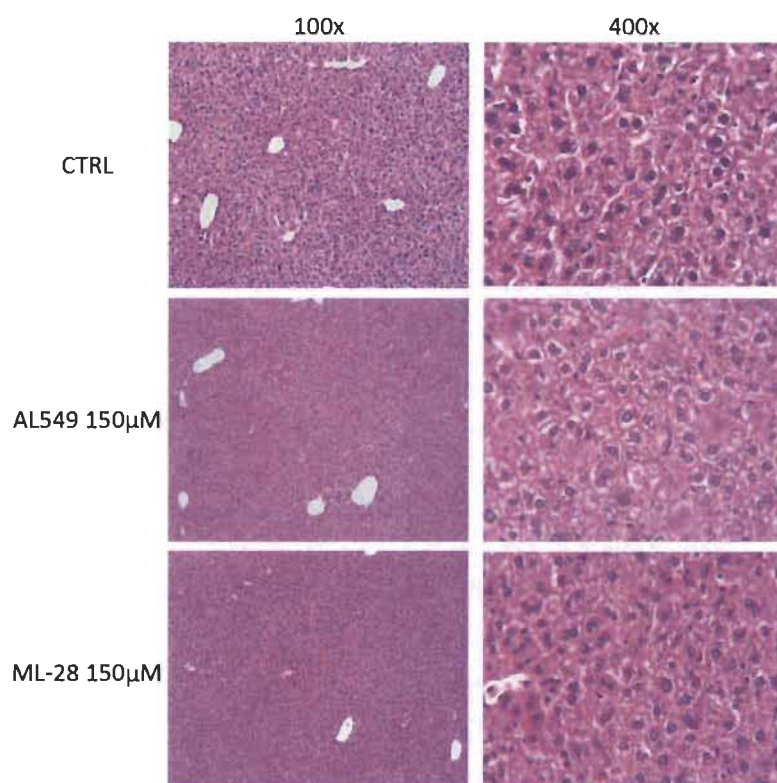


Figure 3.14 Coloration HES des foies de souris C57BL/6J portant des tumeurs MB49-I ectopiques et traitées ou non avec AL-549 ou ML-28.

Le foie de chaque souris a été récupéré à la fin des traitements avec du PBS ou avec AL-549 ou ML-28 à 150 μ M. Vue microscopique de coupes histologiques du tissu hépatiques du groupe témoin et de groupes de souris traitées.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Encore aujourd'hui, avec des taux de récurrence et de progression très élevés, le CUV est un des cancers les plus difficiles à traiter (Canadian Cancer Statistics 2019). Les mécanismes exacts de la récurrence et de la progression vers des tumeurs de CUV hautement agressives n'étant pas encore bien compris, très peu d'alternatives thérapeutiques ont été développées au cours des deux dernières décennies (Carballido et Rosenberg, 2014). Les traitements actuellement utilisés sont en général la chirurgie, le vaccin BCG, la chimiothérapie et la radiothérapie (DeGeorge et al., 2017). Malheureusement, aucun traitement visant spécifiquement cette récurrence n'a encore fait ses preuves. La présente étude avait donc pour but de confirmer le potentiel anticancéreux des DABs en visant la boucle d'activation inflammatoire du CUV humain et murin. Suite aux différentes expérimentations, des résultats très intéressants ont été obtenus dans la perspective d'utilisation de DABs comme traitement alternatif contre le cancer. Parmi ceux-ci, mentionnons rapidement l'inhibition des quelques processus primordiaux au développement tumoral (Gakis, 2014; Lin, Chen, Ye et Zhu, 2003), soit la production de NO par iNOS dans les cellules murines MB49-I, ainsi que l'invasion et la motilité dans les cellules humaines T24.

Comme dans plusieurs autres types de cancer, ce sont les infections et les irritants du milieu vésical, entre autres, qui entraînent une TEM au sein de l'urothélium (Sun et al., 2017). Cette TEM permet l'initiation tumorale et puisque le processus d'inflammation chronique se poursuit, la progression tumorale s'ensuit. Cette progression serait permise, entre autres, grâce aux nombreux facteurs pro-inflammatoires surexprimés par les leucocytes intra-tumoraux. Parmi ceux-ci notons les cytokines IL-6 et TNF α qui

participent activement à la boucle d'activation en activant les facteurs de transcriptions STAT3 et NFκB, respectivement, qui vont à leur tour activer l'expression d'IL-6 et TNFα (Thompson et al., 2015). Ces cytokines vont ainsi favoriser l'expression d'iNOS et par le fait même l'angiogenèse, la motilité et la migration tumorales.

Puisque la validation du potentiel thérapeutique de DABs avait été préalablement effectuée (Hamelin-Morrisette et al., 2015), les conditions optimales pour les tests de voie de signalisation avaient déjà été optimisées. Cette étude démontrait clairement l'effet anti-inflammatoire d'AL-549, un dérivé du PABA, dans certains modèles tumoraux et macrophagiques *in vitro*. De plus, en établissant un lien clair entre le développement tumoral et l'inflammation chronique au niveau vésical, l'évaluation du potentiel anticancéreux de ce DABs était de mise. Cette même étude a démontré que la dose optimale de DAB-1 pour les expériences *in vitro* était de 30 μM. À cette dose, DAB-1 inhibe efficacement la production de NO et l'activation de certaines voies pro-inflammatoires (Hamelin-Morrisette, J., et al. 2015). Nous avons décidé d'utiliser une concentration dix fois plus concentrée et donc, nous avons utilisé 300 μM comme dose maximale pour les études *in vivo*. L'étude de toxicité aigüe a démontré que DAB-1 à 300 μM n'affecte pas la viabilité ni le développement normal de souris (Girouard et al., 2019). À 150 μM, DAB-1 inhibe efficacement la croissance tumorale, la formation de métastases et le taux de mortalité des souris porteuses de tumeurs du cancer de la vessie ectopiques et orthotopiques.

La première section des résultats consistait à l'élucidation du mécanisme d'action d'AL-549 à l'aide des modèles humains et murins du CUV. Pour ce faire, nous avons commencé par effectuer des tests d'immunobuvardage par Western Blot pour pouvoir observer l'impact de DABs sur la phosphorylation de la protéine Iκβ induite par TNFα. Nous avons pu constater qu'effectivement AL-549 à 10 μM inhibait déjà de manière significative la phosphorylation d'Iκβ autant dans les modèles cellulaires murins que les modèles humains du CUV. De plus, une tendance a été observée tout au long des expériences; dans la condition où les cellules ont été prétraitées avec des DABS à 30 μM,

on peut remarquer une légère baisse de la protéine de référence. Ce phénomène pourrait être dû à une baisse de la prolifération cellulaire causée par les DABs. Par la suite, toujours dans l'optique de comprendre la ou les cibles d'AL-549, un test de quantification de NO a été effectué. Rappelons que le NO est un médiateur pro-inflammatoire important favorisant l'angiogenèse (Viallard et Larrivee, 2017). Celui-ci est retrouvé de manière anormalement élevé chez environ 50% des patients atteints du cancer de la vessie (Sandes et al., 2012). Le test de NO nous démontre clairement qu'AL-549 est capable d'inhiber sa production, et ce d'une manière à abaisser son niveau en dessous du niveau basal. Puisque le NO peut être produit par d'autres isoformes que iNOS, soit eNOS et nNOS, il était nécessaire d'étudier l'expression d'iNOS dans notre modèle et l'effet d'AL-549 sur celui-ci. L'expression des autres isoformes n'a pas été étudiée car elles ne sont pas exprimées par les cellules MB49-I (Lodillinsky et al., 2009). Ainsi, il nous a été possible d'observer une baisse de l'expression d'iNOS dans les cellules MB49-I à une dose de 30 μ M. Cette baisse de l'expression d'iNOS concorde donc avec la baisse de l'expression de NO. Finalement, toujours dans la même section, les cellules MB49-I ont été transfectées avec le vecteur « PathDetect NF κ B *cis*-reporting system » l'effet régulateur d'AL-549 sur la voie de signalisation TNF α /NF κ B et l'activité transcriptionnelle. De ce test, plusieurs éléments en ont été tirés. Nous avons observé que même sans activation il y a une activité transcriptionnelle importante de NF κ B et qu'AL-549 est capable d'inhiber cette activité même en dessous du niveau basal. Ces différents tests nous ont permis d'apporter quelques clarifications comme le fait que si AL-549 est capable d'inhiber la luminescence induite par la luciférase en présence de TNF α , cela suggère fortement que cette molécule pourrait agir en amont de la transcription induite par NF κ B, notamment en inhibant I κ B. De plus le fait qu'AL-549 soit capable d'inhiber l'expression d'iNOS à un niveau inférieur au niveau basal suggère qu'elle pourrait agir selon plusieurs mécanismes et sur différentes cibles moléculaires. Effectivement, si l'effet inhibiteur d'AL-549 était exercé seulement en amont de la transcription induite par NF κ B, nous devrions observer un niveau d'inhibition comparable à l'échantillon des cellules témoins de manière à seulement renverser l'effet que l'activation procure. Nous observons plutôt une activité qui renverse non seulement l'activation, mais également qui inhibe l'expression constitutive. Cela suggère fortement que l'effet inhibiteur d'AL-549 pourrait également s'exercer sur la

dimérisation de NF κ B, le transport de NF κ B vers le noyau ou bien sur le domaine de liaison à l'ADN de NF κ B (Balkwill, 2006).

Par la suite, toujours en lien avec la voie de signalisation TNF α /NF κ B, l'invasion des cellules T24 a été étudiée puisque nous avons déjà démontré que l'invasion des cellules T24 est favorisée par des signaux pro-inflammatoires provenant des macrophages M ϕ -1, via un mécanisme dépendant de l'interaction de TNF α avec son récepteur, TNFR1 (Dufresne et al., 2011). De plus, TNF α induit fortement l'expression de la Gélatinase B (Tang et al., 2017), une protéine impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'invasion des cellules tumorales (Gong et al., 2016). Ce test nous a permis d'observer plusieurs phénomènes. Premièrement, nous avons constaté que les cellules T24 ont un niveau d'activité invasive assez importante en présence de macrophages M0 non activés. Deuxièmement, les macrophages M ϕ -1 déposés dans la chambre inférieure du montage (Transwell assay) ont bel et bien induit l'expression des enzymes nécessaires à la dégradation matricielle. Troisièmement, le prétraitement avec AL-549 à une dose de 30 μ M des cellules T24 en co-culture avec des macrophages M ϕ -1 donne un résultat semblable à celui obtenu lorsqu'elles ont été co-incubées avec des macrophages M0. Cette expérience fut importante, car nous avons pu observer concrètement le pouvoir inhibiteur d'AL-549 au niveau de l'activité invasive des cellules T24 en interaction paracrine avec les macrophages M ϕ -1. D'autre part, il est aussi important d'observer qu'AL-549 semble inhiber ou du moins ralentir, l'activité invasive de ces cellules et non de les tuer, probablement en inhibant la communication cellulaire.

Toujours dans l'optique de mieux comprendre le mécanisme d'action d'AL-549, son effet régulateur sur la voie de signalisation IL-6/STAT3 a été étudiée. Encore une fois par Western Blot, dans les modèles humains et murins du CUV, la fluctuation du taux de phosphorylation de p-STAT3 a pu être établie. Nous avons pu constater qu'AL-549 à une dose de 10 μ M inhibait déjà de manière significative la phosphorylation de STAT3 autant dans le modèle cellulaire murin que le modèle humain de CUV. Cette inhibition de la phosphorylation de STAT3 devrait normalement empêcher sa dimérisation et son

transport vers le noyau et, par conséquent, inhiber la transcription des gènes induits par STAT3, notamment celle de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 elle-même (Chang et al., 2013).

Tout comme le lien entre $\text{TNF}\alpha$ et l'invasion, l'inhibition de la voie de signalisation IL-6/STAT3 devait être représentatif d'une caractéristique importante ou développement tumoral; la motilité. Effectivement, la liaison entre IL-6 et son récepteur active la transcription de plusieurs gènes activant la motilité, comme par exemple la vimentine (Chang et al., 2013; Liu, Lin, Tang et Wang, 2015). Dans un premier temps, nous avons observé que les cellules T24 ont un taux de motilité assez important puisque sans activation, 48 h suivant « la blessure », il y a une légère réparation de la blessure indiquant un mouvement cellulaire. Dans un deuxième temps, la motilité tumorale est accentuée lorsque de l'IL-6 est ajouté aux conditions initiales. Finalement, lors de la dernière condition expérimentale, les cellules cancéreuses ont été prétraitées avec AL-549 et l'on peut observer un mouvement similaire à celui des cellules témoins. Ce résultat nous permet de faire un lien entre l'effet inhibiteur moléculaire et cellulaire d'AL-549, de manière similaire à celui établi entre $\text{TNF}\alpha$ et l'invasion.

Pour ce qui est du deuxième objectif, il consistait à déterminer si certaines DABs de deuxième génération possédaient un pouvoir inhibiteur supérieur à AL-549 tout en ayant un effet cytotoxique moindre à concentration égale. Comme mentionné plus haut, nous voulons éviter l'effet cytotoxique puisque cela le rendrait comparable à l'effet plus au moins sélectif des traitements de chimiothérapies ou radiothérapies. De plus, nous voulons empêcher de possibles dommages causés au tissu sain de la vessie, les organes avoisinants et les organes de filtration comme le foie.

Premièrement, un test de quantification de la concentration en NO a été effectué pour déterminer les DABs de deuxième génération les plus efficaces. La première modification apportée à AL-549 a été effectuée au niveau du groupement cyclique de

gauche pour produire la molécule appelée ML-19 (AL-549 hydrogéné), où il y a eu élimination de la liaison double dans la structure du cycle. Le test a clairement démontré que la production de NO n'était aucunement inhibée, même à fortes doses, ce qui laisse sous-entendre que cette double liaison est importante au niveau de l'activité d'AL-549. Par la suite, des groupements acétyles ont été ajoutés pour produire les molécules ML-31E (AL-549 mono-acétylé) et ML-31B (AL-549 di-acétylé). Ces ajouts semblent avoir diminué le pouvoir inhibiteur d'AL-549 sur la production de NO. En effet, les cellules MB49-I prétraitées avec celles-ci ont une production moins élevée en NO que les cellules non prétraitées, mais l'inhibition demeure plus faible par rapport à celle exercée par AL-549. Ceci nous laisse croire que la présence de ces groupements acétyles dans les molécules ML-31E et ML-31B affecte négativement leur activité inhibitrice sur la production de NO. Finalement, la dernière modification apportée fut réalisée au niveau de la branche droite d'AL-549 pour produire la molécule dénommée ML-28 (AL-549 déprotégé et di-acétylé). Les résultats obtenus avec la molécule ML-28 se sont avérés très intéressants car la concentration en NO dans les cellules MB49-I a été inhibée de manière significative et similaire à AL-549. De plus, à une concentration de 30 μ M, ML-28 semble être plus efficace qu'AL-549 en inhibant à plus de 50 % la concentration initiale de NO. Puisque parmi toutes les molécules de deuxième génération, c'est ML-28 qui sembla la plus prometteuse, c'est avec celle-ci que nous avons continué le projet.

Deuxièmement, en ayant déterminé que ML-28 était la molécule de deuxième génération la plus efficace parmi les autres DABs, un test de cytotoxicité a été effectué. Ce test a permis de comparer directement l'effet d'AL-549 et de ML-28 sur la viabilité cellulaire de la lignée MB49-I. Les chiffres montrent un rapport en pourcentage de cellules vivantes prétraitées par rapport aux cellules vivantes non prétraitées. Ce rapport nous indique que pour les cellules prétraitées avec AL-549, le pourcentage de cellules viables passe d'environ 85 % pour le témoin, à environ 70 % dans les cellules traitées. Il est important de noter que pour ce test, la durée du prétraitement a été allongée à une heure au lieu de la demi-heure habituelle pour s'assurer de pouvoir observer des fluctuations. Cette baisse progressive est représentative de nos tests préliminaires qui nous avaient

amenés à rechercher une molécule moins cytotoxique. Pour ce qui est de la molécule ML-28, une très légère baisse est observable passant de 100 % à environ 92 %. Ceci confirme que ML-28 est moins toxique que la molécule initiale, AL-549. Il serait toutefois pertinent d'évaluer la prolifération cellulaire avec des tests supplémentaires pour s'assurer qu'il n'y a aucune compensation mitochondriale.

Par la suite, ML-28 a été testé avec le même genre de test que lors du premier objectif au niveau des voies de signalisation pour s'assurer qu'il possédait le même pouvoir inhibiteur qu'AL-549. Pour ce qui est de la voie de signalisation $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$, une inhibition significative d'environ 25 % est notable à 10 μM de ML-28 chez notre modèle *in vitro* du CUV murin et presque complète à 30 μM . Pour ce qui est des cellules 5637, un modèle cellulaire du CUV humain, l'inhibition de la phosphorylation d' $\text{I}\kappa\beta$ atteint un taux de 50 % à 30 μM . Au niveau de la voie de signalisation IL-6/STAT3, on y observe également un patron d'inhibition de phosphorylation de STAT3 d'environ 50 %. ML-28 semble toutefois exercer un effet inhibiteur un peu plus élevé dans les cellules 5637 puisqu'il y a inhibition de 50 % de l'expression de p-STAT3 à une dose 5 fois inférieure, soit à 10 μM . Ces résultats nous laissent sous-entendre que des mécanismes régulateurs semblables sont partagés par ML-28 et AL-549 puisque les tests de signalisation et de production de NO sont affectés de manière similaire par ces deux molécules. Sommairement, avec les derniers résultats, ML-28 inhibe la production de NO ainsi que les voies de signalisation $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$ et IL-6/STAT3, ce qui, *in vivo*, pourrait avoir un impact négatif sur l'angiogenèse, l'invasion et la motilité; trois caractéristiques déterminantes de l'agressivité tumorale.

Finalement, pour confirmer le potentiel anticancéreux de ML-28 et pouvoir réellement établir une comparaison avec AL-549, un test *in vivo* était de mise. Les résultats obtenus démontrent que tout comme AL-549, ML-28 inhibe efficacement l'apparition de métastases pulmonaires, sans affecter les cellules hépatiques selon les coupes histologiques. Par contre, aucun biomarqueur hépatique n'a été utilisé lors de cette expérience, ce qui aurait permis de mieux évaluer le niveau de toxicité relative de ML-28

par rapport à AL-549. Le CUV, sous sa forme invasive, va affecter les organes pelviens environnant comme la prostate, mais aussi les poumons. Effectivement, les métastases pulmonaires surviennent de manière régulière lorsque le CUV atteint le stade T4, de manière que les personnes atteintes auront jusqu'à avoir des symptômes pulmonaires avant d'en détecter au niveau vésical (Agrawal et al., 2017). Les coupes histologiques des poumons de souris témoins nous montraient clairement la présence de plusieurs métastases pulmonaires, tandis que pour nos souris traitées avec ML-28, il n'y en avait aucune de détectable. De plus, de manière générale, les souris traitées avec ML-28 présentaient des tailles tumorales plus petites que les souris traitées avec AL-549.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Pour commencer, nos études ont permis de valider notre hypothèse de départ car nous avons pu établir que des molécules, comme les DABs, ayant la capacité d'inhiber les voies pro-inflammatoires pourraient également inhiber la progression tumorale dans un modèle animal de cancer, comme le CUV. En effet, nous avons utilisé des DABs dans un contexte d'inflammation associée au cancer afin d'inhiber ce processus et avons de ce fait, également observé une inhibition marquée des caractéristiques propres à la progression tumorale. Nous avons d'abord réussi à inhiber l'expression du système iNOS/NO, un facteur important de l'angiogenèse, la phosphorylation d' $\text{I}\kappa\beta$ et l'invasion tumorale et finalement, la phosphorylation de STAT3 et la mobilité cellulaire.

Le premier objectif consistait à la découverte du mécanisme d'action du AL-549. Malheureusement, le mécanisme d'action ou bien la cible précise de cette molécule n'a toujours pas été découvert, mais une avancée a tout de même été effectuée. Effectivement, nous avons découvert que ce DAB agissait en amont de la transcription induite par NF κ B. De plus, grâce à son pouvoir inhibiteur qui va au-delà du niveau basal de l'expression de certaines protéines, il laisse sous-entendre qu'il possède plusieurs cibles ou mécanismes d'action.

Pour ce qui est du deuxième objectif, c'est-à-dire de déterminer si un des DABs de deuxième génération était plus efficace et moins cytotoxique qu'AL-549, il a été atteint. La molécule ML-28 a démontré être une molécule avec un pouvoir inhibiteur légèrement supérieur à AL-549, tout en possédant une activité moins cytotoxique. De plus, son potentiel anticancéreux a été prouvé grâce à une étude *in vivo* où des souris ont été traitées

de manière périodique avec ML-28 et ont montré un volume tumoral plus petit que les autres souris ainsi qu'une absence de métastases pulmonaires.

Ce projet présente de nombreuses perspectives de recherche vu le grand potentiel anticancéreux des DABs. Tout d'abord, puisque l'inflammation chronique menant au développement tumoral est un concept établi dans plusieurs types de cancer, comme le cancer du sein, il serait pertinent de le tester chez d'autres modèles cellulaires cancéreux (Bhatelia, Singh et Singh, 2014). Également, l'optimisation des DABs est possible puisqu'il a été déterminé qu'en modifiant la structure d'AL-549, ses pouvoirs anti-inflammatoire et anticancéreux pouvaient être augmentés. Les DABs présentent donc un potentiel important comme immunothérapie pouvant probablement être utilisés en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie. Ils pourraient également être administrés suite à une chirurgie afin de limiter la récurrence importante du CUV. Finalement, les DABs seraient de bons candidats pour tester leur pouvoir inhibiteur, mais cette fois-ci dans un contexte d'inflammation aiguë et non chronique.

En résumé, nous avons fait un pas de plus dans la compréhension du mécanisme d'action des DABs et dans son optimisation. Nous avons également confirmé le pouvoir anticancéreux d'AL-549 ainsi que de son homologue ML-28, dans le but de pouvoir trouver un traitement alternatif efficace contre l'agressivité et la récurrence du CUV.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agrawal, A., Sahni, S., Vulisha, A. K., Gumpeni, R., Shah, R. et Talwar, A. (2017). Pulmonary manifestations of urothelial carcinoma of the bladder. *Respir Med*, 128, 65-69. doi: 10.1016/j.rmed.2017.05.006
- Al-Zalabani, A. H., Stewart, K. F., Wesseliuss, A., Schols, A. M. et Zeegers, M. P. (2016). Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*, 31(9), 811-851. doi: 10.1007/s10654-016-0138-6
- Alfaro, C., Sanmamed, M. F., Rodriguez-Ruiz, M. E., Teijeira, A., Onate, C., Gonzalez, A., . . . Melero, I. (2017). Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treat Rev*, 60, 24-31. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.08.004
- Andersson, K. E. et Arner, A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 84(3), 935-986. doi: 10.1152/physrev.00038.2003
- Balkwill, F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 25(3), 409-416. doi: 10.1007/s10555-006-9005-3
- Baud, V. et Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 8(1), 33-40. doi: 10.1038/nrd2781
- Belgorosky, D., Langle, Y., Prack Mc Cormick, B., Colombo, L., Sandes, E. et Eijan, A. M. (2014). Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express iNOS. *Nitric Oxide*, 36, 11-18. doi: 10.1016/j.niox.2013.10.010
- Bender, C. M., Pao, M. M. et Jones, P. A. (1998). Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res*, 58(1), 95-101.
- Berdik, C. (2017). Unlocking bladder cancer. *Nature*, 551(7679), S34-S35. doi: 10.1038/551S34a
- Besaratinia, A. et Tommasi, S. (2013). Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. *FASEB J*, 27(6), 2090-2100. doi: 10.1096/fj.12-227074
- Bharti, R., Dey, G. et Mandal, M. (2016). Cancer development, chemoresistance, epithelial to mesenchymal transition and stem cells: A snapshot of IL-6 mediated involvement. *Cancer Lett*, 375(1), 51-61. doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.048

- Bhatelia, K., Singh, K. et Singh, R. (2014). TLRs: linking inflammation and breast cancer. *Cell Signal*, 26(11), 2350-2357. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.035
- Birder, L. et Andersson, K. E. (2013). Urothelial signaling. *Physiol Rev*, 93(2), 653-680. doi: 10.1152/physrev.00030.2012
- Blanchette, J., Jaramillo, M. et Olivier, M. (2003). Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology*, 108(4), 513-522.
- Bosshart, H. et Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med*, 4(21), 438. doi: 10.21037/atm.2016.08.53
- Burke, A. J., Sullivan, F. J., Giles, F. J. et Glynn, S. A. (2013). The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*, 34(3), 503-512. doi: 10.1093/carcin/bgt034
- Carballido, E. M. et Rosenberg, J. E. (2014). Optimal treatment for metastatic bladder cancer. *Curr Oncol Rep*, 16(9), 404. doi: 10.1007/s11912-014-0404-2
- Cardiff, R. D., Miller, C. H. et Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014(6), 655-658. doi: 10.1101/pdb.prot073411
- Cassini-Vieira, P., Araujo, F. A., da Costa Dias, F. L., Russo, R. C., Andrade, S. P., Teixeira, M. M. et Barcelos, L. S. (2015). iNOS Activity Modulates Inflammation, Angiogenesis, and Tissue Fibrosis in Polyether-Polyurethane Synthetic Implants. *Mediators Inflamm*, 2015, 138461. doi: 10.1155/2015/138461
- Chan, J. K. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*, 22(1), 12-32. doi: 10.1177/1066896913517939
- Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S. P., Daly, L., . . . Bromberg, J. (2013). The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*, 15(7), 848-862.
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M. M., McGuire, F., Nagarkatti, P. S. et Nagarkatti, M. (2013). Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*, 27(6), 669-684.
- Chen, G. et Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296(5573), 1634-1635. doi: 10.1126/science.1071924
- Collart, M. A., Baeuerle, P. et Vassalli, P. (1990). Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, 10(4), 1498-1506.

- Creagh, E. M., Conroy, H. et Martin, S. J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*, 193, 10-21.
- Cribier, B. et Grosshans, E. (1995). [Quadri-chromic staining in routine cutaneous histopathology (hematoxylin, eosin, saffron and astra blue)]. *Ann Dermatol Venereol*, 122(11-12), 758-763.
- Dallagi, A., Girouard, J., Hamelin-Morrisette, J., Dadzie, R., Laurent, L., Vaillancourt, C., . . . Reyes-Moreno, C. (2015). The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell Mol Immunol*, 12(3), 326-341. doi: 10.1038/cmi.2014.50
- DeGeorge, K. C., Holt, H. R. et Hodges, S. C. (2017). Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 96(8), 507-514.
- Dobrush, J., Daneshmand, S., Fisch, M., Lotan, Y., Noon, A. P., Resnick, M. J., . . . Boorjian, S. A. (2016). Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol*, 69(2), 300-310. doi: 10.1016/j.eururo.2015.08.037
- Dufresne, M., Dumas, G., Asselin, E., Carrier, C., Pouliot, M. et Reyes-Moreno, C. (2011). Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. *Mol Immunol*, 48(12-13), 1556-1567. doi: 10.1016/j.molimm.2011.04.022
- El Hage, F., Abouzahr-Rifai, S., Meslin, F., Mami-Chouaib, F. et Chouaib, S. (2008). [Immune response and cancer]. *Bull Cancer*, 95(1), 57-67. doi:10.1684/bdc.2008.0558
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
- Erdmann, J. (2017). Genetics: A clearer view. *Nature*, 551(7679), S44-S45. doi: 10.1038/551S44a
- Fabris, V. T., Lodillinsky, C., Pampera, M. B., Belgorosky, D., Lanari, C. et Eijan, A. M. (2012). Cytogenetic characterization of the murine bladder cancer model MB49 and the derived invasive line MB49-I. *Cancer Genet*, 205(4), 168-176. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.02.002
- Fernandes, J. V., Cobucci, R. N., Jatoba, C. A., Fernandes, T. A., de Azevedo, J. W. et de Araujo, J. M. (2015). The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res*, 21(3), 527-534. doi: 10.1007/s12253-015-9913-z
- Ferrari de Andrade, L., Tay, R. E., Pan, D., Luoma, A. M., Ito, Y., Badrinath, S., . . . Wucherpfennig, K. W. (2018). Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science*, 359(6383), 1537-1542. doi: 10.1126/science.aao0505

- Fry, C. H. et Vahabi, B. (2016). The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 119 Suppl 3, 57-62. doi: 10.1111/bcpt.12626
- Fuge, O., Vasdev, N., Allchorne, P. et Green, J. S. (2015). Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol*, 7, 65-79. doi: 10.2147/RRU.S63447
- Gakis, G. (2014). The role of inflammation in bladder cancer. *Adv Exp Med Biol*, 816, 183-196. doi: 10.1007/978-3-0348-0837-8_8
- Girouard, J., Belgorosky, D., Hamelin-Morrisette, J., Boulanger, V., D'Orio, E., Ramla, D., . . . Reyes-Moreno, C. (2019). Molecular therapy with derivatives of amino benzoic acid inhibits tumor growth and metastasis in murine models of bladder cancer through inhibition of TNFalpha/NFKappaB and iNOS/NO pathways. *Biochem Pharmacol*, 113778. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113778
- Golka, K., Wiese, A., Assennato, G. et Bolt, H. M. (2004). Occupational exposure and urological cancer. *World J Urol*, 21(6), 382-391. doi: 10.1007/s00345-003-0377-5
- Gong, L., Wu, D., Zou, J., Chen, J., Chen, L., Chen, Y., . . . Yuan, H. (2016). Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(14), 18458-18468. doi: 10.18632/oncotarget.7607
- Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L. C., Goode, J., Miething, C., . . . Karin, M. (2007). NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*, 130(5), 918-931. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.009
- Hagemann, T., Robinson, S. C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F. R. et Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 25(8), 1543-1549. doi: 10.1093/carcin/bgh146
- Hagemann, T., Wilson, J., Kulbe, H., Li, N. F., Leinster, D. A., Charles, K., . . . Balkwill, F. R. (2005). Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol*, 175(2), 1197-1205. doi: 10.4049/jimmunol.175.2.1197
- Hamelin-Morrisette, J., Cloutier, S., Girouard, J., Belgorosky, D., Eijan, A. M., Legault, J., . . . Berube, G. (2015). Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells. *Eur J Med Chem*, 96, 259-268. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.026
- He, C. (1996). Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer Lett*, 106(2), 185-191.

- Hu, X. et Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*, 31(4), 539-550. doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.002
- Hussain, S. P., He, P., Subleski, J., Hofseth, L. J., Trivers, G. E., Mechanic, L., . . . Harris, C. C. (2008). Nitric oxide is a key component in inflammation- accelerated tumorigenesis. *Cancer Res*, 68(17), 7130-7136. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0410
- Itoh, M., Murata, T., Suzuki, T., Shindoh, M., Nakajima, K., Imai, K. et Yoshida, K. (2006). Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene*, 25(8), 1195-1204. doi: 10.1038/sj.onc.1209149
- Jenkins, D. C., Charles, I. G., Thomsen, L. L., Moss, D. W., Holmes, L. S., Baylis, S. A., . . . Moncada, S. (1995). Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10), 4392-4396.
- Ji, Z., He, L., Regev, A. et Struhl, K. (2019). Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(19), 9453-9462. doi: 10.1073/pnas.1821068116
- Jin, F., Thaiparambil, J., Donepudi, S. R., Vantaku, V., Piyaathna, D. W. B., Maity, S., . . . Putluri, N. (2017). Tobacco-Specific Carcinogens Induce Hypermethylation, DNA Adducts, and DNA Damage in Bladder Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 10(10), 588-597. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0198
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., . . . Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333-339. doi: 10.1038/nature12634
- Kang, Y. J., Koo, E. B., Lee, Y. S., Yun-Choi, H. S. et Chang, K. C. (1999). Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by a novel positive inotropic agent, YS 49, in rat vascular smooth muscle and RAW 264.7 macrophages. *Br J Pharmacol*, 128(2), 357-364. doi: 10.1038/sj.bjp.0702787
- Kantor, A. F., Hartge, P., Hoover, R. N., Narayana, A. S., Sullivan, J. W. et Fraumeni, J. F., Jr. (1984). Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol*, 119(4), 510-515.
- Karashima, T., Sweeney, P., Kamat, A., Huang, S., Kim, S. J., Bar-Eli, M., . . . Dinney, C. P. (2003). Nuclear factor-kappaB mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8. *Clin Cancer Res*, 9(7), 2786-2797.
- Kataoka, M., Ishibashi, K., Kumagai, S., Yanagida, T., Aikawa, K., Chiba, H. et Kojima, Y. (2015). Expression and Function of LPA1 in Bladder Cancer. *J Urol*, 194(1), 238-244. doi: 10.1016/j.juro.2014.12.028

- Klotz, T., Bloch, W., Jacobs, G., Niggemann, S., Engelmann, U. et Addicks, K. (1999). Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. *Urology*, 54(3), 416-419.
- Knowles, M. A. (2007). Tumor suppressor loci in bladder cancer. *Front Biosci*, 12, 2233-2251.
- Knowles, M. A. et Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, 15(1), 25-41. doi: 10.1038/nrc3817
- Kostourou, V., Cartwright, J. E., Johnstone, A. P., Boulton, J. K., Cullis, E. R., Whitley, G. et Robinson, S. P. (2011). The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br J Cancer*, 104(1), 83-90. doi: 10.1038/sj.bjc.6606034
- Kowalewicz-Kulbat, M. et Loch, C. (2017). BCG and protection against inflammatory and auto-immune diseases. *Expert Rev Vaccines*, 16(7), 1-10. doi: 10.1080/14760584.2017.1333906
- Kwan, M. L., Garren, B., Nielsen, M. E. et Tang, L. (2018). Lifestyle and nutritional modifiable factors in the prevention and treatment of bladder cancer. *Urol Oncol*. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.03.019
- La Vecchia, C., Negri, E., D'Avanzo, B., Savoldelli, R. et Franceschi, S. (1991). Genital and urinary tract diseases and bladder cancer. *Cancer Res*, 51(2), 629-631.
- Lai, J. L., Liu, Y. H., Liu, C., Qi, M. P., Liu, R. N., Zhu, X. F., . . . Hu, C. M. (2017). Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*, 40(1), 1-12. doi: 10.1007/s10753-016-0447-7
- LaRue, H., Ayari, C., Bergeron, A. et Fradet, Y. (2013). Toll-like receptors in urothelial cells--targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*, 10(9), 537-545. doi: 10.1038/nrurol.2013.153
- Lazzeri, M. (2006). The physiological function of the urothelium--more than a simple barrier. *Urol Int*, 76(4), 289-295. doi: 10.1159/000092049
- Lechner, M., Lirk, P. et Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*, 15(4), 277-289. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.004
- Lee, C. H., Woo, Y. C., Wang, Y., Yeung, C. Y., Xu, A. et Lam, K. S. (2015). Obesity, adipokines and cancer: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 83(2), 147-156. doi: 10.1111/cen.12667
- Letasiova, S., Medve'ova, A., Sovcikova, A., Dusinska, M., Volkovova, K., Mosoiu, C. et Bartonova, A. (2012). Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health*, 11 Suppl 1, S11. doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S11

- Li, J., Yin, J., Shen, W., Gao, R., Liu, Y., Chen, Y., . . . Luo, N. (2017). TLR4 Promotes Breast Cancer Metastasis via Akt/GSK3 β /Catenin Pathway upon LPS Stimulation. *Anat Rec (Hoboken)*, 300(7), 1219-1229. doi: 10.1002/ar.23590
- Li, P., Chen, J. et Miyamoto, H. (2017). Androgen Receptor Signaling in Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*, 9(2). doi: 10.3390/cancers9020020
- Lin, Z., Chen, S., Ye, C. et Zhu, S. (2003). Nitric oxide synthase expression in human bladder cancer and its relation to angiogenesis. *Urol Res*, 31(4), 232-235. doi: 10.1007/s00240-003-0302-9
- Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J. et Wang, Y. K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), 15966-15983. doi: 10.18632/oncotarget.3862
- Lodillinsky, C., Rodriguez, V., Vauthay, L., Sandes, E., Casabe, A. et Eijan, A. M. (2009). Novel invasive orthotopic bladder cancer model with high cathepsin B activity resembling human bladder cancer. *J Urol*, 182(2), 749-755. doi: 10.1016/j.juro.2009.03.076
- Malats, N. et Real, F. X. (2015). Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29(2), 177-189, vii. doi: 10.1016/j.hoc.2014.10.001
- Mandai, M., Hamanishi, J., Abiko, K., Matsumura, N., Baba, T. et Konishi, I. (2016). Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res*, 22(10), 2329-2334. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0224
- Martinez Rodriguez, R. H., Buisan Rueda, O. et Ibarz, L. (2017). Bladder cancer: Present and future. *Med Clin (Barc)*, 149(10), 449-455. doi: 10.1016/j.medcli.2017.06.009
- Menon, M. B., Ronkina, N., Schwermann, J., Kotlyarov, A. et Gaestel, M. (2009). Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(12), 1041-1047. doi: 10.1002/cm.20418
- Merrill, L., Gonzalez, E. J., Girard, B. M. et Vizzard, M. A. (2016). Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nat Rev Urol*, 13(4), 193-204. doi: 10.1038/nrurol.2016.13
- Mizushima, T., Tirador, K. A. et Miyamoto, H. (2017). Androgen receptor activation: a prospective therapeutic target for bladder cancer? *Expert Opin Ther Targets*, 21(3), 249-257. doi: 10.1080/14728222.2017.1280468
- Mojic, M., Takeda, K. et Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci*, 19(1). doi: 10.3390/ijms19010089

- Morris, K. R., Lutz, R. D., Choi, H. S., Kamitani, T., Chmura, K. et Chan, E. D. (2003). Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. *Infect Immun*, 71(3), 1442-1452.
- Navarro Silvera, S. A. et Rohan, T. E. (2007). Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control*, 18(1), 7-27. doi: 10.1007/s10552-006-0057-z
- Nesi, G., Nobili, S., Cai, T., Caini, S. et Santi, R. (2015). Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch*, 467(6), 623-633. doi: 10.1007/s00428-015-1820-x
- Noguchi, J. L., Liss, M. A. et Parsons, J. K. (2015). Obesity, Physical Activity and Bladder Cancer. *Curr Urol Rep*, 16(10), 74. doi: 10.1007/s11934-015-0546-2
- O'Toole, C., Perlmann, P., Unsgaard, B., Moberger, G. et Edsmyr, F. (1972). Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy. *Int J Cancer*, 10(1), 77-91.
- Pekarova, M., Lojek, A., Martiskova, H., Vasicek, O., Bino, L., Klinke, A., . . . Kubala, L. (2011). New role for L-arginine in regulation of inducible nitric-oxide-synthase-derived superoxide anion production in raw 264.7 macrophages. *ScientificWorldJournal*, 11, 2443-2457. doi: 10.1100/2011/321979
- Perez-Jacoiste Asin, M. A., Fernandez-Ruiz, M., Lopez-Medrano, F., Lumbreras, C., Tejido, A., San Juan, R., . . . Aguado, J. M. (2014). Bacillus Calmette-Guerin (BCG) infection following intravesical BCG administration as adjunctive therapy for bladder cancer: incidence, risk factors, and outcome in a single-institution series and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 93(17), 236-254. doi: 10.1097/MD.0000000000000119
- Petes, C., Wynick, C., Guzzo, C., Mehta, D., Logan, S., Banfield, B. W., . . . Gee, K. (2017). IL-27 enhances LPS-induced IL-1beta in human monocytes and murine macrophages. *J Leukoc Biol*, 102(1), 83-94. doi: 10.1189/jlb.3A0316-098R
- Pinto-Leite, R., Carreira, I., Melo, J., Ferreira, S. I., Ribeiro, I., Ferreira, J., . . . Santos, L. (2014). Genomic characterization of three urinary bladder cancer cell lines: understanding genomic types of urinary bladder cancer. *Tumour Biol*, 35(5), 4599-4617. doi: 10.1007/s13277-013-1604-3
- Plum, J., Huang, C., Grabensee, B., Schror, K. et Meyer-Kirchrath, J. (2002). Prostacyclin enhances the expression of LPS/INF-gamma-induced nitric oxide synthase in human monocytes. *Nephron*, 91(3), 391-398. doi: 10.1159/000064278
- Poh, A. R. et Ernst, M. (2018). Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol*, 8, 49. doi: 10.3389/fonc.2018.00049

- Rottner, M., Freyssinet, J. M. et Martinez, M. C. (2009). Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res*, 10, 23. doi: 10.1186/1465-9921-10-23
- Sandes, E. O., Lodillinsky, C., Langle, Y., Belgorosky, D., Marino, L., Gimenez, L., . . . Eijan, A. M. (2012). Inducible nitric oxide synthase and PPARgamma are involved in bladder cancer progression. *J Urol*, 188(3), 967-973. doi: 10.1016/j.juro.2012.04.099
- Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M. et Flavell, R. A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*, 9(4), 447-453. doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008
- Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E. et Lotan, Y. (2017). Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17022. doi: 10.1038/nrdp.2017.22
- Sawicka, E., Lisowska, A., Kowal, P. et Dlugosz, A. (2015). [The role of oxidative stress in bladder cancer]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 69, 744-752. doi: 10.5604/17322693.1160361
- Shinko, D., Diakos, C. I., Clarke, S. J. et Charles, K. A. (2017). Cancer-Related Systemic Inflammation: The Challenges and Therapeutic Opportunities for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*, 102(4), 599-610. doi: 10.1002/cpt.789
- Sipos, F. et Galamb, O. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol*, 18(7), 601-608. doi: 10.3748/wjg.v18.i7.601
- Smith, S. G. et Zaharoff, D. A. (2016). Future directions in bladder cancer immunotherapy: towards adaptive immunity. *Immunotherapy*, 8(3), 351-365. doi: 10.2217/imt.15.122
- Son, Y. H., Jeong, Y. T., Lee, K. A., Choi, K. H., Kim, S. M., Rhim, B. Y. et Kim, K. (2008). Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 51(1), 71-77. doi: 10.1097/FJC.0b013e31815bd23d
- Staack, A., Hayward, S. W., Baskin, L. S. et Cunha, G. R. (2005). Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation*, 73(4), 121-133. doi: 10.1111/j.1432-0436.2005.00014.x
- Sui, G. P., Rothery, S., Dupont, E., Fry, C. H. et Severs, N. J. (2002). Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. *BJU Int*, 90(1), 118-129.

- Sui, X., Lei, L., Chen, L., Xie, T. et Li, X. (2017). Inflammatory microenvironment in the initiation and progression of bladder cancer. *Oncotarget*, 8(54), 93279-93294. doi: 10.18632/oncotarget.21565
- Summerhayes, I. C. et Franks, L. M. (1979). Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst*, 62(4), 1017-1023.
- Sun, X., Deng, Q., Liang, Z., Liu, Z., Geng, H., Zhao, L., . . . Zhong, C. (2017). Cigarette smoke extract induces epithelial-mesenchymal transition of human bladder cancer T24 cells through activation of ERK1/2 pathway. *Biomed Pharmacother*, 86, 457-465. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.022
- Sundar Rajan, V., Laurent, V. M., Verdier, C. et Duperray, A. (2017). Unraveling the Receptor-Ligand Interactions between Bladder Cancer Cells and the Endothelium Using AFM. *Biophys J*, 112(6), 1246-1257. doi: 10.1016/j.bpj.2017.01.033
- Tang, D., Tao, D., Fang, Y., Deng, C., Xu, Q. et Zhou, J. (2017). TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res*, 23, 141-149.
- Thompson, D. B., Siref, L. E., Feloney, M. P., Hauke, R. J. et Agrawal, D. K. (2015). Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer. *Expert Rev Clin Immunol*, 11(2), 265-279. doi: 10.1586/1744666X.2015.983082
- Viallard, C. et Larrivee, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9
- Vodvarka, P. et Jancova, J. (1988). Bacterial infection of urine in patients with bladder cancer. *Neoplasma*, 35(2), 243-250.
- Walter, M. J., Look, D. C., Tidwell, R. M., Roswit, W. T. et Holtzman, M. J. (1997). Targeted inhibition of interferon-gamma-dependent intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression using dominant-negative Stat1. *J Biol Chem*, 272(45), 28582-28589.
- Wang, Y., Liu, J., Yang, X., Liu, Y., Liu, Y., Li, Y., . . . Niu, H. (2018). Bacillus Calmette-Guerin and anti-PD-L1 combination therapy boosts immune response against bladder cancer. *Onco Targets Ther*, 11, 2891-2899. doi: 10.2147/OTT.S165840
- Wherry, E. J. et Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 486-499. doi: 10.1038/nri3862
- Wong, M. C. S., Fung, F. D. H., Leung, C., Cheung, W. W. L., Goggins, W. B. et Ng, C. F. (2018). The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep*, 8(1), 1129. doi: 10.1038/s41598-018-19199-z

- Xu, A., Ahsanul Kabir Khan, M., Chen, F., Zhong, Z., Chen, H. C. et Song, Y. (2016). Overexpression of autotaxin is associated with human renal cell carcinoma and bladder carcinoma and their progression. *Med Oncol*, 33(11), 131. doi: 10.1007/s12032-016-0836-7
- Yu, W. B. et Rao, J. Y. (2019). Programmed death ligand-1/programmed death-1 inhibition therapy and programmed death ligand-1 expression in urothelial bladder carcinoma. *Chronic Dis Transl Med*, 5(3), 170-177. doi: 10.1016/j.cdtm.2019.08.003
- Zhang, Q., Mao, Z. et Sun, J. (2019). NF-kappaB inhibitor, BAY11-7082, suppresses M2 tumor-associated macrophage induced EMT potential via miR-30a/NF- kappaB/Snail signaling in bladder cancer cells. *Gene*, 710, 91-97. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.039
- Zhou, T. C., Sankin, A. I., Porcelli, S. A., Perlin, D. S., Schoenberg, M. P. et Zang, X. (2017). A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: From mediator of immune escape to target for treatment. *Urol Oncol*, 35(1), 14-20. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.10.004
- Zhu, Z., Shen, Z. et Xu, C. (2012). Inflammatory pathways as promising targets to increase chemotherapy response in bladder cancer. *Mediators Inflamm*, 2012, 528690. doi: 10.1155/2012/528690

ANNEXE A

TESTS DE VIABILITÉ DES CELLULES MB49-I PRÉTRAITÉES AVEC AL-549

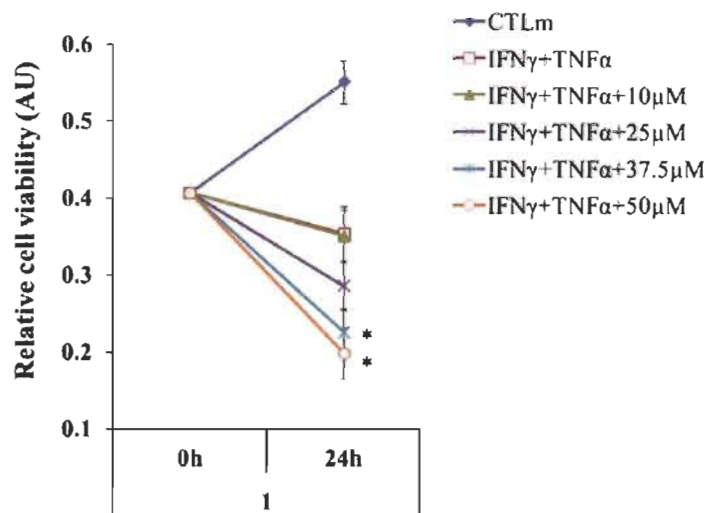


Figure A.1 Représentation de la viabilité relative des cellules MB49-I prétraitées avec AL-549 à différentes concentrations et activées ou non par des cytokines pro-inflammatoires. (Hamelin-Morrisette et al., 2015)